А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Albert L. Lehninger

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

The Johns Hopkins University
School of Medicine

Worth Publishers, Inc.

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

2

Перевод с английского
М. Г. Дуниной
и
канд. мед. наук С. Н. Преображенского

под редакцией
акад. В. А. Энгельгардта
и
проф. Я. М. Варшавского



МОСКВА «МИР» 1985

УДК 577.1
Л44
ББК 28.072

Ленинджер А.

Л44 Основы биохимии: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ.– М.: Мир, 1985.–368 с., ил.

Имя крупного американского биохимика А. Ленинджера уже известно советским читателям по его книге «Биохимия», выпущенной в русском переводе издательством «Мир» в 1974 г. Новая книга представляет собой фундаментальное учебное пособие, предназначенное для изучения основ биологической химии.

Во второй том вошли материалы по биоэнергетике и метаболизму клетки. Рассмотрены роль глюкозы в биоэнергетических процессах, цикл лимонной кислоты, электронный транспорт, окислительное фосфорилирование, регуляция образования АТФ, окисление жирных кислот в тканях животных, окислительный распад аминокислот, биосинтез углеводов, липидов, нуклеотидов, аминокислот, а также фотосинтез.

Предназначена для биологов разных специальностей, медиков, студентов и всех лиц, интересующихся молекулярными основами процессов жизнедеятельности.

Л $\frac{2001040000-285}{041(01)-85}$ св. пл. подписных изданий 1985 г. **ББК 28.072 57.04**

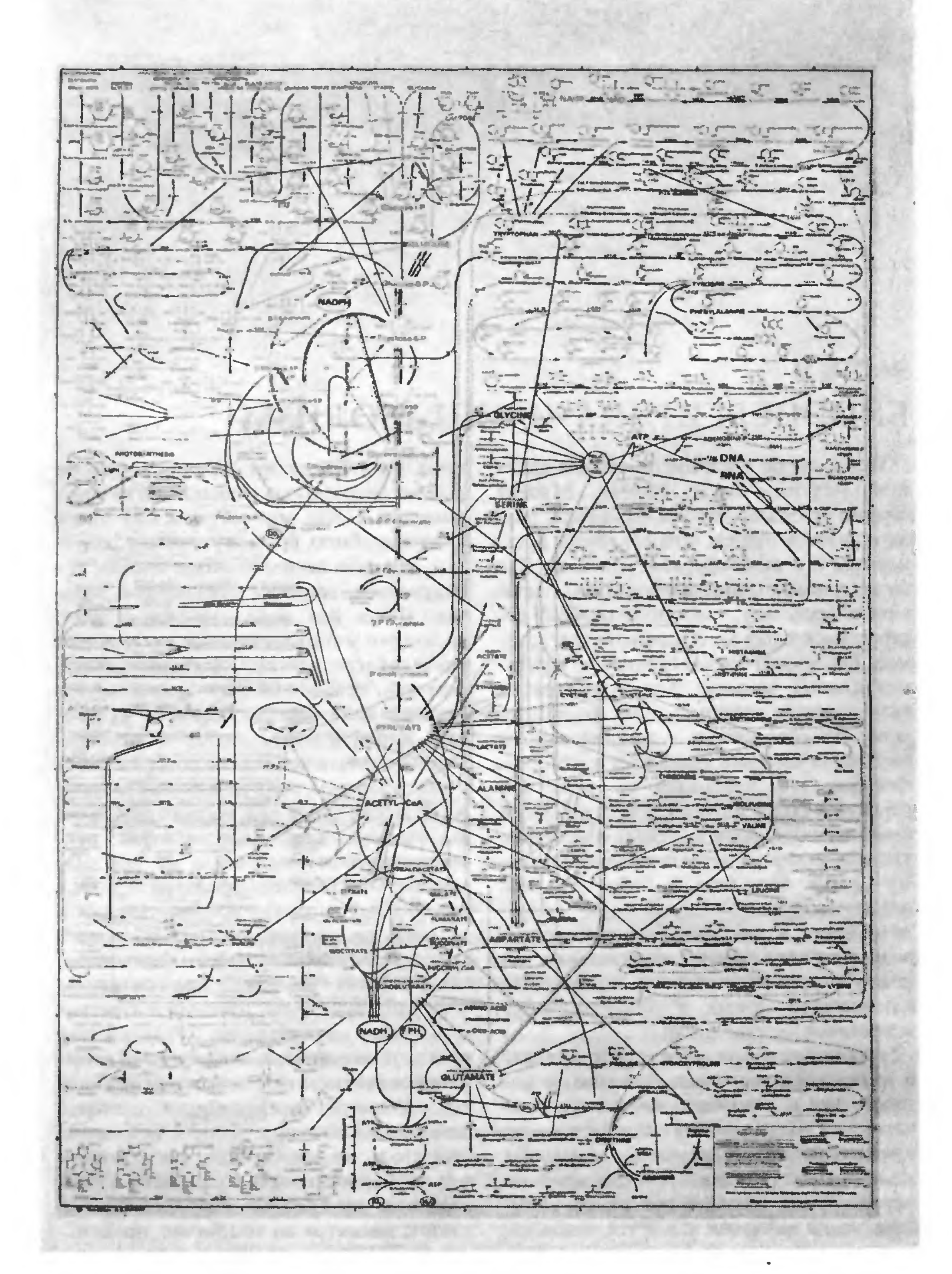
Редакция биологической литературы

ЧАСТЬ II

БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

И мы, люди, и все другие живые существа устроены очень сложно. Многие смутно осознают, что эта сложность поддерживается пищей, потребляемой организмом и в нем перерабатываемой. Для физика, однако, живые организмы составляют проблему, имеющую особый интерес, поскольку их существование, казалось бы, противоречит одному из фундаментальных законов физики. Согласно этому закону, известному как второй закон термодинамики, организованные скопления материи стремятся к дезорганизации, т. е. стремятся со временем перейти в более неупорядоченную, неорганизованную форму. Теперь мы знаем, что живые клетки тоже подчиняются этому закону. Они только «обходят» его, поддерживая свою внутреннюю упорядоченность в динамическом стационарном состоянии за счет питательных веществ и свободной энергии, получаемых из внешней среды и преобразуемых в процессе метаболизма.

Чтобы составить себе представление о путях клеточного метаболизма, о его энергетике и динамике, нам следует начать наше рассмотрение с энергетических изменений, характеризующих отдельные химические реакции, катализируемые ферментами в условиях постоянства температуры и давления, т. е. в тех условиях, которые существуют в клетках. Мы узнаем при этом, каким образом катализируемые ферментами реакции могут объединяться в цепи, или системы, благодаря наличию общих промежуточных продуктов, что обеспечивает возможность эффективного переноса химической энергии. Далее мы познакомимся с центральными метаболическими путями, или последовательностями ферментативных реакций, приводящими к расщеплению главных питательных веществ – углеводов, жиров и аминокислот – с одновременным запасанием части содержащейся в них свободной энергии в форме энергии АТР. После этого мы рассмотрим, этап за этапом, некоторые важные центральные пути биосинтеза, на которых главные макромолекулы клетки строятся из простых молекул-предшественников за счет химической энергии. Скорость этих метаболических путей – как синтеза, так и распада – находится под контролем и регулируется очень тонкими и чувствительными механизмами. Результатом всей этой активности, включающей координированную активность сотен ферментов, является фантастически сложная сеть ферментативных реакций, действующая столь же эффективно, как компьютер, чтобы обеспечить сохранение и поддержание внутренней упорядоченности клеток, несмотря на колебания, происходящие во внешней среде.


NADPH
GLYCINE
SERINE
ATP
DNA
RNA
PYRUVATE
ACETYL-CoA
ALANINE
ASPARTATE
NADH
GLUTAMATE
TRYPTOPHAN
PHENYLALANINE
PHOTOSYNTHESIS

ГЛАВА 13

МЕТАБОЛИЗМ. ОБЩИЙ ОБЗОР

В живых клетках протекает множество ферментативных реакций. Всю совокупность этих реакций мы объединяем общим понятием *метаболизм*, однако неверно было бы думать, что клетка–это не более чем мембранный мешок, в котором ферменты действуют случайным, неупорядоченным образом. Метаболизм представляет собой высококоординированную и целенаправленную клеточную активность, обеспечиваемую участием многих взаимосвязанных мультиферментных систем. Он выполняет четыре специфические функции: 1) снабжение химической энергией, которая добывается путем расщепления богатых энергией пищевых веществ, поступающих в организм из среды, или путем преобразования улавливаемой энергии солнечного света; 2) превращение молекул пищевых веществ в строительные блоки, которые используются в дальнейшем клеткой для построения макромолекул; 3) сборку белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов и прочих клеточных компонентов из этих строительных блоков; 4) синтез и разрушение тех биомолекул, которые необходимы для выполнения каких-либо специфических функций данной клетки.

Метаболическая карта. Известно уже более 2000 ферментов, участвующих в метаболизме клеток, и многие еще несомненно предстоит открыть. Часть этих ферментов работает на главных, «торных», путях метаболизма. Другие катализируют образование многих специализированных продуктов, требующихся лишь в небольших количествах. Все метаболические пути в конечном счете взаимосвязаны. Мы будем изучать метаболизм так, как, например, знакомится с городом человек, впервые попавший в столицу, т.е. мы начнем это изучение с его главных «проспектов», от которых затем уже можно будет перейти к любым боковым «улицам» или «переулкам».

Хотя метаболизм слагается из сотен различных ферментативных реакций, центральные метаболические пути, которые нас обычно больше всего интересуют, немногочисленны и почти у всех живых форм в принципе едины. В этой обзорной главе мы рассмотрим источники веществ и энергии для метаболизма, центральные метаболические пути, используемые для синтеза и распада главных клеточных компонентов, механизмы, участвующие в передаче химической энергии, и, наконец, те экспериментальные подходы, с помощью которых ведется изучение метаболических путей.

13.1. Живые организмы принимают участие в круговороте углерода и кислорода

Наше рассмотрение мы начнем с макроскопических аспектов метаболизма, с общего метаболического взаимодействия между живыми организмами биосферы. Все живые организмы можно подразделить на две большие группы в зависимости от того, в какой химической форме способны они усваивать поступающий из среды углерод. *Автотрофные* клетки («сами себя питающие») могут использовать в качестве единственного источника углерода атмосфер-

ную CO_2, из которой они и строят все свои углеродсодержащие биомолекулы. К этой группе принадлежат фотосинтезирующие бактерии и клетки листьев зеленых растений. Некоторые автотрофы, например цианобактерии, могут также использовать для синтеза всех своих азотсодержащих компонентов азот атмосферы. *Гетеротрофные* клетки («питающиеся за счет других») не обладают способностью усваивать атмосферную CO_2; они должны получать углерод в виде достаточно сложных органических соединений, таких, как, например, глюкоза. К гетеротрофам относятся клетки высших животных и большинство микроорганизмов. Автотрофы, сами себя обеспечивающие всем необходимым для жизни, обладают определенной независимостью, тогда как гетеротрофы, нуждающиеся в сложных источниках углерода, питаются продуктами жизнедеятельности других клеток.

Есть между этими двумя группами и еще одно важное различие. Многие автотрофные организмы осуществляют фотосинтез, т.е. обладают способностью использовать энергию солнечного света, тогда как гетеротрофные клетки добывают необходимую им энергию, расщепляя органические соединения, вырабатываемые автотрофами. В биосфере автотрофы и гетеротрофы сосуществуют как участники единого гигантского цикла, в котором автотрофные организмы строят из атмосферной CO_2 органические биомолекулы и часть их при этом выделяет в атмосферу кислород. Гетеротрофы используют вырабатываемые автотрофами органические продукты в качестве пищи и возвращают в атмосферу CO_2. Таким путем совершается непрерывный круговорот углерода и кислорода между животным и растительным миром. Источником энергии для этого колоссального по своим масштабам процесса служит солнечный свет (рис. 13-1).

Автотрофные и гетеротрофные организмы можно в свою очередь разделить на подклассы. Существует, например, два больших подкласса гетеротрофов: аэробы и анаэробы. *Аэробы* живут в среде, содержащей кислород, и окисляют органические питательные вещества молекулярным кислородом. *Анаэробам* для окисления питательных веществ кислород не требуется; они обитают в бескислородной среде. Многие клетки, например дрожжевые, могут существовать как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Такие организмы называют *факультативными анаэробами*. Однако для *облигатных анаэробов*, не способных использовать кислород, последний является ядом. Таковы, например, организмы, обитающие глубоко в почве или на морском дне. Большинство гетеротрофных клеток, в особенности клетки высших организмов,– факультативные анаэробы, но при наличии кислорода они используют для окисления питательных веществ аэробные метаболические пути.

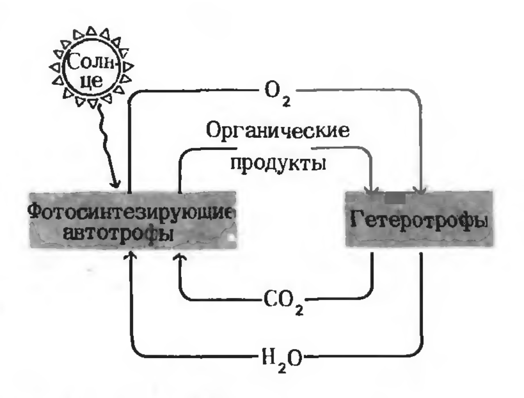


Рис. 13-1. Круговорот двуокиси углерода и круговорот кислорода между двумя областями биосферы Земли – фотосинтезирующей и гетеротрофной. Масштабы этого круговорота огромны. За год в биосфере совершает круговорот свыше $3{,}5 \cdot 10^{11}$ т углерода. Баланс между образованием и потреблением CO_2 – один из важных факторов, определяющих климат на Земле. Содержание CO_2 в атмосфере возросло за последние 100 лет примерно на 25% из-за все более усиливающегося сжигания угля и нефти. Некоторые ученые утверждают, что дальнейшее увеличение количества атмосферной CO_2 повлечет за собой повышение средней температуры атмосферы («парниковый эффект»); не все, однако, согласны с этим, поскольку трудно определить точно количества CO_2, образующейся и вовлекаемой в повторные циклы в биосфере, а также поглощаемой океанами. Для того чтобы вся атмосферная CO_2 была пропущена через растения, требуется около 300 лет.

У одного и того же организма разные группы клеток могут принадлежать к

разным классам. Например, у высших растений зеленые хлорофиллсодержащие клетки листа – фотосинтезирующие автотрофы, а бесхлорофилльные клетки корня – гетеротрофы. Более того, зеленые клетки листьев только днем ведут автотрофное существование. В темное время суток они функционируют как гетеротрофы и добывают необходимую им энергию путем окисления углеводов, синтезированных ими на свету.

13.2. В биосфере существует круговорот азота

Всем живым организмам помимо источников углерода, кислорода и энергии необходим еще и источник азота. Азот требуется для биосинтеза аминокислот, а также пуриновых и пиримидиновых оснований, т. е. тех азотсодержащих строительных блоков, из которых затем производится сборка белков и нуклеиновых кислот. И здесь мы встречаем уже знакомые нам различия: живые организмы сильно различаются в зависимости от того, в какой химической форме способны они усваивать азот. Почти все высшие животные должны получать по крайней мере часть необходимого им азота в виде аминокислот. Например, в рацион человека и белой крысы 10 из 20 обычных аминокислот должны входить в готовом виде, потому что их организм не способен синтезировать эти аминокислоты из более простых предшественников. Растения могут обычно использовать в качестве единственного источника азота аммиак или растворимые нитраты. Лишь сравнительно немногие организмы обладают способностью усваивать (фиксировать) газообразный азот (N_2), на долю которого приходится около 80% нашей атмосферы. Однако, поскольку в земной коре содержится очень мало неорганического азота в виде растворимых солей, все живые организмы зависят в конечном счете от этого атмосферного азота и от организмов, способных его фиксировать. Азот фиксируют, например, цианобактерии (старое их название – сине-зеленые водоросли). Цианобактерии ведут независимое существование, потому что они полностью автотрофны. Они не только усваивают атмосферный азот, но способны и к фотосинтезу, т. е. могут удовлетворять всю свою потребность в углероде за счет атмосферной CO_2. Почти все другие виды азотфиксирующих бактерий обитают в почве. Некоторые из них живут в качестве симбионтов в корневых клубеньках определенных видов растений, главным образом представителей семейства бобовых, и осуществляют здесь *симбиотическую фиксацию азота.*

Нитрифицирующие бактерии окисляют аммиак до нитритов и нитратов, а *денитрифицирующие* вновь превращают нитраты в аммиак. Таким образом, помимо гигантских круговоротов углерода и кислорода (рис. 13-1) в нашей биосфере протекает еще и круговорот азота, в котором колоссальные количества азота претерпевают циклические превращения (рис. 13-2). Круговороты углерода, кислорода и азота, совершающиеся при участии многих видов живых организмов, несомненно зависят от поддержания определенного баланса между продуцентами и консументами в биосфере

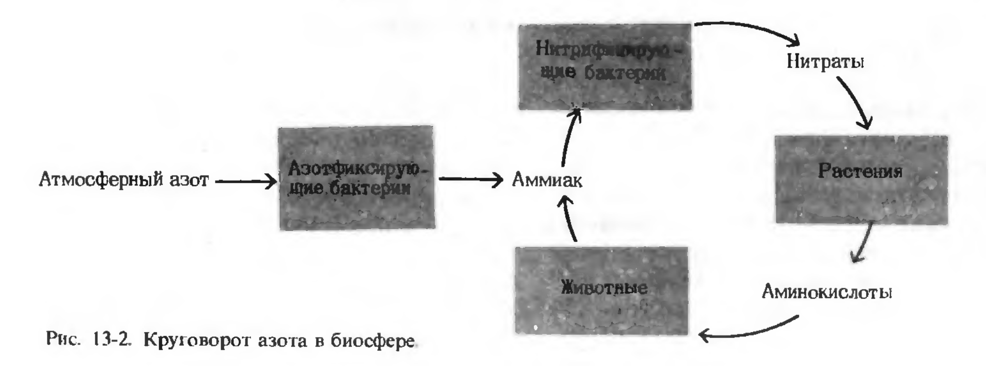


Рис. 13-2. Круговорот азота в биосфере



Рис. 13-3. Поток солнечной энергии и круговорот углерода, кислорода и азота на примере одной из экосистем. В этой изолированной экосистеме в результате фотосинтеза, осуществляемого травянистой растительностью, фиксируется атмосферная CO_2, образуются органические соединения и выделяется кислород. Почвенные микроорганизмы фиксируют атмосферный азот, переводя его в аммиак и нитраты, используемые затем растениями в качестве источников азота для синтеза белков и нуклеиновых кислот. Зебры получают кислород из воздуха, а необходимый им углерод и аминокислоты - из растений в результате окисления крахмала, белка и других компонентов растительной пищи. Львы поедают зебр, а их экскременты попадают в почву, где микроорганизмы перерабатывают их, завершая цикл.
Движущей силой всего этого круговорота служит солнечная энергия. Однако в каждом звене данной пищевой цепи на построение биомассы расходуется менее 10% всей получаемой полезной энергии; остальная энергия рассеивается в среде и становится недоступной. Из всей солнечной энергии, достигающей этой экосистемы, в организме львов запасается менее 0,1%. Вот почему для того, чтобы прокормить стадо зебр, требуется очень обширная территория, а для того, чтобы прокормить двух львов,- большое стадо зебр.

(рис. 13-3). Эти гигантские по своим масштабам круговороты веществ в биосфере сопровождаются таким же гигантским круговоротом энергии. Фотосинтезирующие организмы улавливают солнечную энергию и продуцируют богатые энергией углеводы и другие органические соединения, а гетеротрофные организмы используют эти органические соединения в качестве источников энергии. В метаболизме каждого организма, участвующего в этих метаболических циклах и расходующего энергию на разного рода работу, какая-то часть усвояемой организмом (полезной) формы энергии теряется, тогда как количество неусвояемой (недоступной, бесполезной) формы растет. Почти на каждой стадии этих биологических циклов тепло и другие формы энергии рассеиваются в окружающей среде, т.е. переходят в неупорядоченную и неусвояемую для живых организмов форму. Таким образом, поток энергии в биосфере - это однонаправленный, а не циклический процесс, поскольку полезная энергия не может быть регенерирована из недоступной, рассеянной. Углерод, кислород и азот совершают непрерывный круговорот, вовлекаясь во все новые и новые циклы, между тем как полезная энергия непрерывно «деградирует» - переходит в неусвояемую форму.

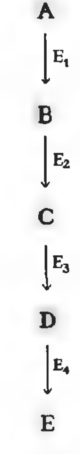
Перейдем теперь от этих макроскопических аспектов метаболизма к метаболическим событиям, совершающимся в живых клетках на микроскопическом уровне, не упуская при этом, однако, из виду, что каждый тип клеток характеризуется особыми, ему одному свойственными потребностями в тех или иных источниках углерода, кислорода и азота, а также в соответствующих источниках энергии. Клеточный метаболизм - это система ферментативных превращений как веществ, так и энергии, начинающихся от исходных продуктов и завершающихся биосинтезом живой материи.

13.3. Метаболические пути представляют собой последовательности реакций, катализируемых мультиферментными системами

Ферменты - это простейшие единицы метаболической активности; каждый из них катализирует какую-нибудь одну химическую реакцию. Метаболизм, однако, лучше рассматривать исходя из представления о *мультиферментных системах*, каждая из которых катализирует последовательные стадии данного метаболического пути. Такие мультиферментные системы могут включать от 2 до

20 ферментов, действующих совместно, в определенной последовательности, так что продукт реакции, катализируемой первым ферментом, становится субстратом для следующей реакции, катализируемой вторым ферментом, и т. д. (рис. 13-4). Продукты последовательных превращений, объединяемых в данный метаболический путь (В, С, D и т. д. на рис. 13-4), называются *промежуточными продуктами* или *метаболитами*. На каждой из последовательных стадий того или иного метаболического пути происходит обычно лишь небольшое химическое изменение, чаще всего – удаление, перенос или присоединение какого-нибудь атома, молекулы или функциональной группы. В результате этих упорядоченных, поэтапных, изменений исходная биомолекула превращается в соответствующий конечный продукт. Большей частью метаболические пути линейны, хотя могут быть и циклическими (рис. 13-4). Обычно они имеют разветвления, в которых какие-нибудь продукты реакций выходят из цепи реакций данного метаболического пути или, наоборот, вливаются в нее. В наиболее употребительном значении термин «метаболизм» равнозначен «обмену веществ и энергии»; в более точном и узком смысле «метаболизм» означает промежуточный обмен, т. е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

Линейный метаболический путь. Предшественник А превращается в продукт Е в результате четырех последовательных ферментативных реакций. Продукт одной ферментативной реакции служит при этом субстратом следующей



Циклический путь. Именно таким путем происходит окисление ацетильных групп до CO_2 и H_2O в цикле лимонной кислоты

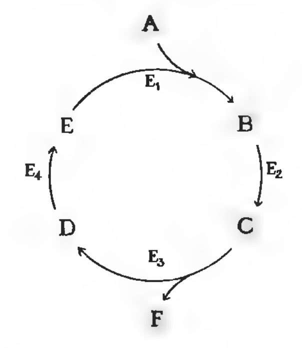


Рис. 13-4. Мультиферментные системы.

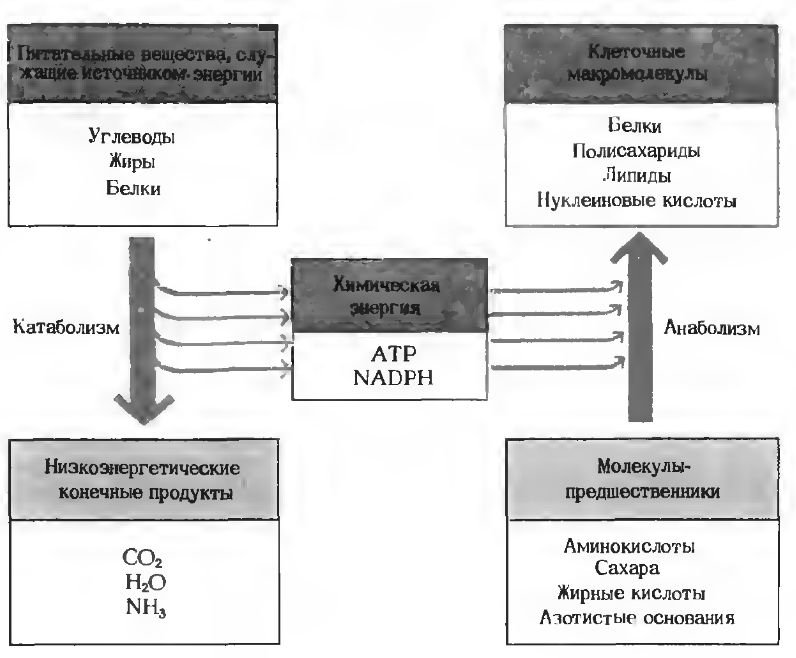
13.4. Метаболизм включает катаболические и анаболические пути (процессы распада и процессы синтеза)

Промежуточный метаболизм складывается из двух фаз – *катаболизма* и *анаболизма*. Катаболизм – это фаза, в которой происходит *расщепление* сложных органических молекул до более простых конечных продуктов. Углеводы, жиры и белки, поступившие извне с пищей или присутствующие в самой клетке в качестве запасных веществ, распадаются в серии последовательных реакций до таких соединений, как молочная кислота, CO_2 и аммиак. Катаболические процессы сопровождаются высвобождением свободной энергии, заключенной в сложной структуре больших органических молекул. На определенных этапах соответствующих катаболических путей значительная часть свободной энергии запасается благодаря сопряженным ферментативным реакциям в форме высокоэнергетического соединения – *аденозинтрифосфата* (АТР). Часть ее запасается также в богатых энергией водородных атомах кофермента *никотинамидадениндинуклеотидфосфата*, находящегося в

восстановленной форме (обозначается NADPH) (рис. 13-5).

Анаболизм, называемый также *биосинтезом*,– это та фаза метаболизма, в которой из малых молекул-предшественников, или «строительных блоков», синтезируются белки, нуклеиновые кислоты и другие макромолекулярные компоненты клеток. Поскольку биосинтез – это процесс, в результате которого увеличиваются размеры молекул и усложняется их структура, он требует затраты свободной энергии. Источником этой энергии служит распад ATP до ADP и неорганического фосфата. Для биосинтеза некоторых клеточных компонентов требуются также богатые энергией водородные атомы, донором которых является NADPH (рис. 13-5). Катаболические и анаболические реакции протекают в клетках одновременно, однако их скорости регулируются независимо.

Рис. 13-5. Энергетические взаимосвязи между катаболическим и анаболическим путями. Катаболические пути поставляют химическую энергию в форме ATP и NADPH. Эта энергия используется на анаболических путях для биосинтеза макромолекул из небольших молекул-предшественников.



13.5. Катаболические пути сходятся – образуется лишь небольшое число конечных продуктов

Рассмотрим теперь катаболизм более подробно. Ферментативное расщепление тех главных питательных веществ, которые служат клетке источником энергии, а именно углеводов, жиров и белков совершается постепенно – через ряд последовательных ферментативных реакций. В аэробном катаболизме различают три главные стадии (рис. 13-6). На стадии I макромолекулы клетки распадаются на свои основные строительные блоки: полисахариды распадаются до гексоз или пентоз, жиры – до жирных кислот, глицерола и других компонентов, а белки – до аминокислот, которых имеется 20 видов.

Все эти различные продукты, образовавшиеся на первой стадии катаболизма, на стадии II превращаются в еще более простые соединения, число которых сравнительно невелико. Гексозы, пентозы и глицерол расщепляются до одного и того же трехуглеродного промежуточного продукта – *пирувата*, а затем до единственной двухуглеродной формы – ацетильной группы *ацетилкофермента*

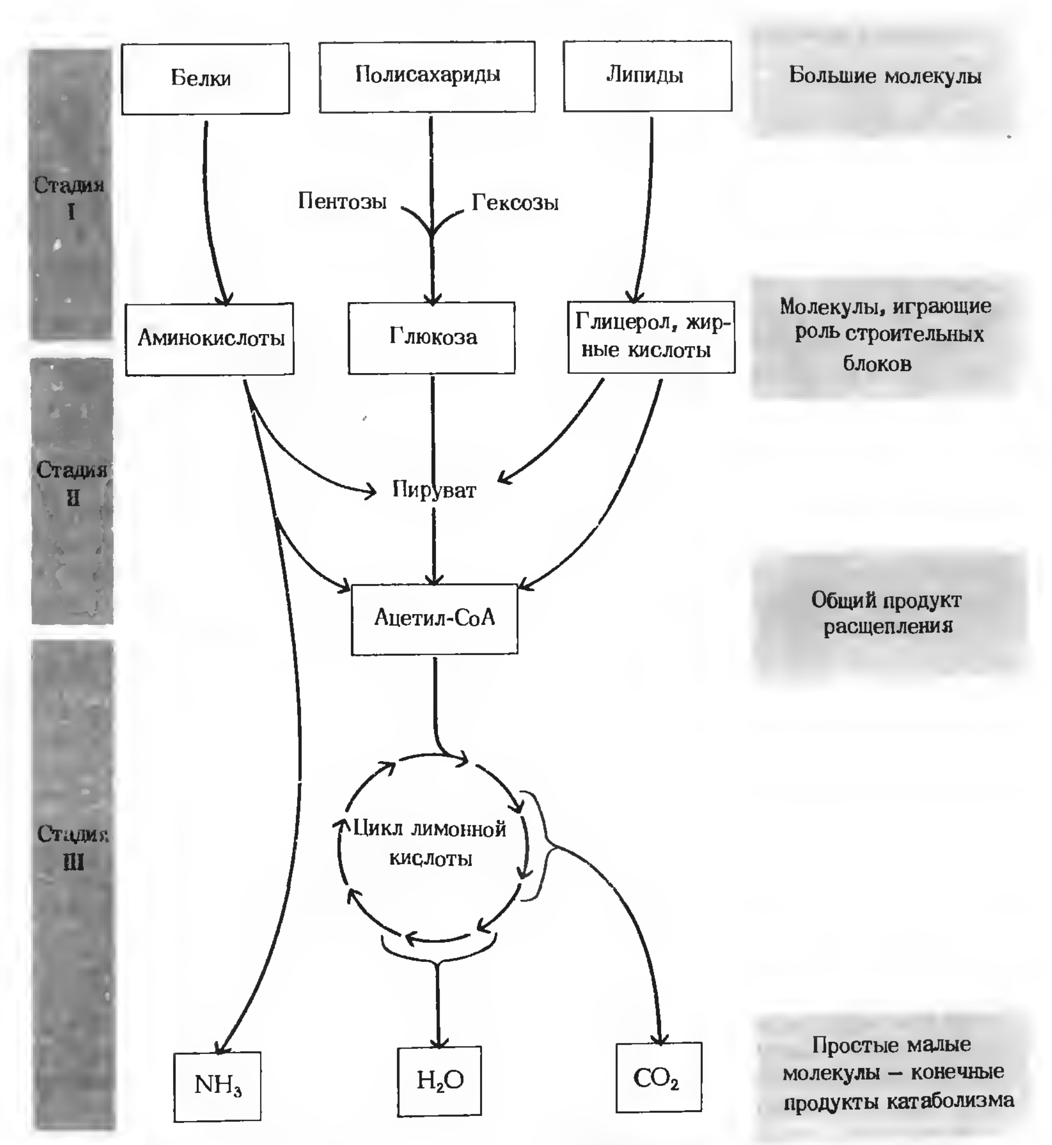


Рис. 13-6. Три стадии катаболических превращений основных питательных веществ клетки. На стадии I сотни белков и многие виды полисахаридов и липидов расщепляются на составляющие их строительные блоки. На стадии II эти строительные блоки превращаются в один общий продукт – ацетильную группу ацетил-СоА. На стадии III различные катаболические пути сливаются в один общий путь – цикл лимонной кислоты; в результате всех этих превращений образуются только три конечных продукта. Расщепление нуклеиновых кислот происходит также поэтапно, но здесь этот процесс не показан, поскольку его вклад в удовлетворение энергетических нужд клетки сравнительно невелик.

А (ацетил-СоА). Аналогичное превращение претерпевают жирные кислоты и углеродные скелеты большей части аминокислот: их расщепление также завершается образованием ацетильных групп в форме ацетил-СоА. Таким образом, ацетил-СоА представляет собой общий конечный продукт второй стадии катаболизма.

На стадии III ацетильная группа ацетил-СоА вступает в *цикл лимонной кислоты* – общий конечный путь, на котором почти все виды клеточного «топлива»

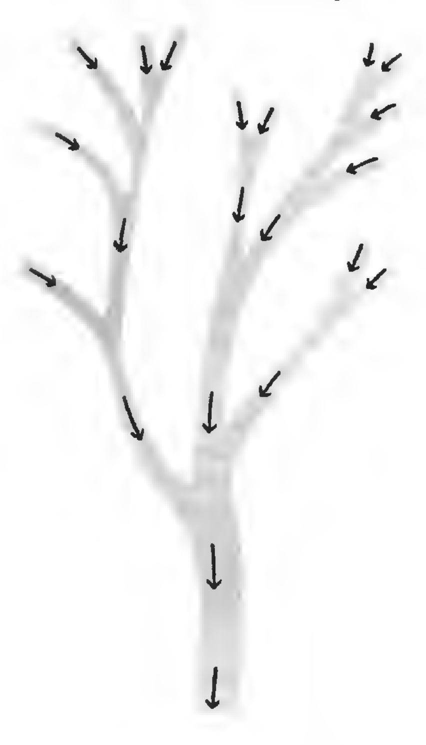




Рис. 13-7. Конвергенция катаболических путей и дивергенция анаболических путей. На первой стадии катаболизма в него вовлекается много различных клеточных компонентов, но в конце все пути сходятся в один общий метаболический путь, и число конечных продуктов оказывается небольшим.

окисляются в конце концов до двуокиси углерода. Конечными продуктами метаболизма являются также вода и аммиак (или другие азотсодержащие соединения).

Важно отметить, что катаболические пути *сходятся*, вливаясь на стадии III в этот общий путь – цикл лимонной кислоты. Если на стадии I десятки и даже сотни различных белков расщепляются до аминокислот, которых насчитывается 20 видов, то уже на стадии II из всех 20 аминокислот образуются в основном только ацетил-СоА и аммиак (NH_3), а на стадии III ацетильные группы ацетил-СоА, окисляясь в цикле лимонной кислоты, превращаются только в два продукта – CO_2 и H_2O. Точно так же многие полисахариды и дисахариды расщепляются на стадии I до нескольких простых сахаров, а эти сахара на стадии II превращаются в конечном счете в ацетил-СоА и на стадии III – в CO_2 и H_2O. Конечный путь катаболизма можно уподобить реке в ее нижнем течении, где она расширяется благодаря тому, что ранее вобрала в себя многие притоки (рис. 13-7).

13.6. Биосинтетические (анаболические) пути расходятся – образуется много разных продуктов

Анаболизм, или биосинтез, начинающийся с малых молекул-предшественников, протекает также в три стадии. Синтез белков, например, начинается с образования α-кетокислот и других пред-

шественников. На второй стадии происходит аминирование α-кетокислот в реакциях с донорами аминогрупп – образуются α-аминокислоты. Наконец, на последней, завершающей стадии анаболизма из аминокислот строятся полипептидные цепи и образуются различные белки. Сходным образом синтезируются липиды. Их синтез начинается с включения ацетильных групп в жирные кислоты и завершается сборкой различных липидных молекул из этих жирных кислот. В отличие от катаболизма для анаболизма характерно расхождение метаболических путей. Из сравнительно небольшого числа простых молекул-предшественников образуется в конечном счете весьма широкий набор разнообразных макромолекул (рис. 13-7). На центральных путях анаболизма имеется много ответвлений, что и дает в результате сотни различных клеточных компонентов.

Каждая из главных стадий катаболизма или анаболизма данной биомолекулы катализируется мультиферментной системой. Последовательности химических превращений на каждом из центральных метаболических путей в принципе у всех живых форм едины. Так, например, расщепление D-глюкозы протекает почти у всех живых организмов одинаково, т.е. через те же реакции и с образованием одних и тех же промежуточных продуктов.

13.7. Соответствующие катаболические и анаболические пути различаются, и эти различия имеют важное значение

Катаболический путь и соответствующий ему, но противоположный по направлению анаболический путь между данным предшественником и данным продуктом обычно не совпадают. Могут различаться и промежуточные продукты, и отдельные стадии этих путей. Например, протекающее в печени расщепление глюкозы до пирувата представляет собой процесс, состоящий из 11 последовательных стадий, катализируемых специфичными ферментами. Казалось бы, синтез глюкозы из пирувата должен быть простым обращением всех этих ферментативных стадий ее распада; такой путь представляется на первый взгляд и самым естественным, и наиболее экономичным. Однако в действительности биосинтез глюкозы в печени протекает иначе. Он включает лишь 9 из 11 ферментативных стадий, участвующих в ее распаде, а две недостающие стадии заменены в нем совсем другим набором ферментативных реакций, свойственным одному только биосинтетическому пути. Точно так же неидентичны и соответствующие пути катаболизма и анаболизма, связывающие, например, белки с аминокислотами или жирные кислоты с ацетил-СоА.

Можно было бы счесть ненужным расточительством наличие двух отдельных метаболических путей между двумя данными пунктами. Есть, однако, важные причины для того, чтобы катаболические и анаболические пути не совпадали. Первая из них заключается в том, что путь, по которому идет расщепление той или иной биомолекулы, может быть непригодным для ее биосинтеза по энергетическим соображениям. Расщепление какой-нибудь сложной органической молекулы можно сравнить со спуском с горы, а ее биосинтез – с подъемом в гору; в первом случае свободная энергия выделяется, а во втором ее требуется затратить, чтобы осилить подъем. Попробуем пояснить это с помощью простой аналогии. Если столкнуть с вершины горы валун, то он покатится вниз, теряя при этом энергию. На некоторых, особо крутых участках пути, при отвесном падении, теряются сразу большие количества энергии. Втащить валун трактором на вершину по тому же пути, по которому он скатился вниз, скорее всего не удастся. Трактор сможет, вероятно, подняться вверх по более пологой дороге, минуя крутые склоны (рис. 13-8). На этот обходный путь потребуется дополнительная энергия. Биосинтетический путь тоже требует дополнительных затрат энергии на преодоление крутых участков энергетической «горки».

Вторая причина, по которой соответствующие катаболические и анаболические пути неидентичны, состоит в том,

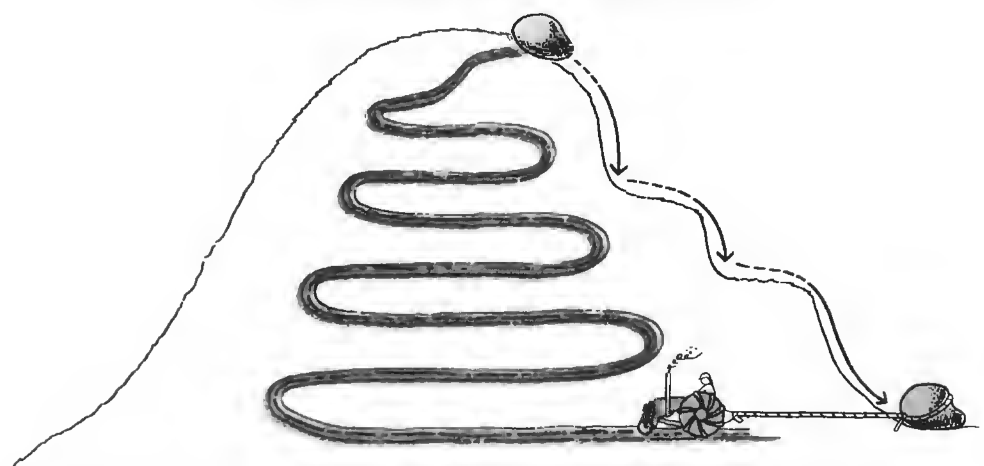


Рис. 13-8. Аналогия, поясняющая энергетические аспекты катаболизма и анаболизма на примере скатывающегося с горы валуна. Катаболизм можно сравнить со спуском с горы, так как он сопровождается потерей свободной энергии. Особенно много энергии теряется на крутых, почти отвесных участках пути (обозначены стрелками). Анаболизм напоминает подъем в гору; он требует затраты свободной энергии, которая может поступать лишь небольшими, строго определенными порциями. Трактор, например, смог бы втащить валун обратно на вершину горы только при условии, что он пройдет другим, более пологим путем, минуя крутые участки, на преодоление которых потребовалось бы слишком много энергии.

что эти последовательности реакций должны регулироваться раздельно. Если бы для расщепления и для биосинтеза использовался один и тот же путь, т. е. имело бы место простое обращение последовательности реакций, то, например, торможение катаболического пути вследствие ингибирования одного из его ферментов неизбежно влекло бы за собой также и замедление соответствующего биосинтетического пути. Для того чтобы синтез и распад какого-либо соединения могли регулироваться независимо друг от друга, эти метаболические пути должны быть совершенно различными, а если у них все же имеются какие-то общие ферментативные стадии, то регулировать скорость процесса должны те ферменты, которые в противоположной последовательности реакций не участвуют (рис. 13-9).

Иногда противоположно направленные катаболические и анаболические пути различаются по своей локализации. Так, например, окисление жирных кислот до стадии ацетил-СоА в печени катализируется набором ферментов, локализованных по преимуществу в митохондриях, где условия благоприятствуют окислению; синтез же жирных кислот из

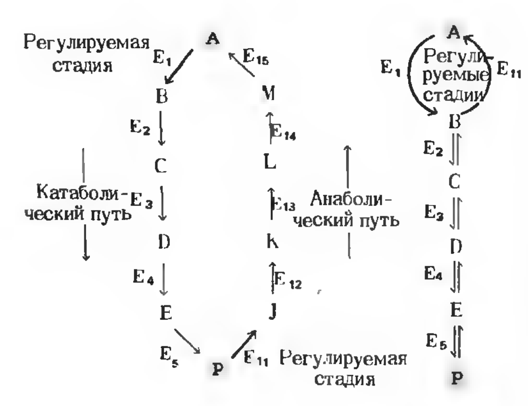


Рис. 13-9. Параллельные катаболические и анаболические пути должны быть различными хотя бы на одной из ферментативных стадий, для того чтобы они могли регулироваться независимо. Показаны два варианта независимой регуляции катаболического и анаболического путей между А и Р. В первом варианте эти пути совершенно различны, т. е. катализируются разными наборами ферментов. Во втором – анаболический и катаболический пути различаются лишь по одному ферменту. Регулируемые стадии в обоих вариантах обозначены красными стрелками.

ацетил-СоА, требующий водородных атомов, т.е. восстановительной способности, осуществляется с помощью другого набора ферментов, локализованных в цитозоле, где условия благоприятствуют восстановительным реакциям (рис. 13-10).

Однако хотя соответствующие катаболические и анаболические пути неидентичны, их связывает общая стадия (стадия III на рис. 13-6), которая включает в себя цикл лимонной кислоты и некоторые вспомогательные ферментативные реакции. Эту общую стадию называют иногда *амфиболической* стадией метаболизма (от греч. «amfi» – оба), поскольку она выполняет *двойную* функцию. В катаболизме на этой стадии завершается распад сравнительно небольших молекул, образовавшихся на стадии II, а в анаболизме ее роль заключается в поставке небольших молекул-предшественников для биосинтеза аминокислот, жирных кислот и углеводов (об этом мы еще будем говорить далее).

Почти все метаболические реакции в конечном счете связаны между собой, поскольку продукт одной ферментативной реакции служит субстратом для другой, которая в данном процессе играет роль следующей стадии. Таким образом, мы можем представить себе метаболизм в виде чрезвычайно сложной сети ферментативных реакций. Если поток питательных веществ в какой-нибудь одной части этой сети уменьшится или нарушится, то в ответ могут произойти изменения в другой части сети, для того чтобы это первое изменение было как-то уравновешено или скомпенсировано. На любом из центральных метаболических путей – катаболическом или анаболическом – скорость может регулироваться в соответствии с сиюминутными потребностями клетки. Более того, и катаболические, и анаболические реакции отрегулированы, по-видимому, таким образом, чтобы они протекали наиболее экономно, т.е. с наименьшей возможной затратой энергии и веществ. Например, окисление питательных веществ в клетке совершается со скоростью, как раз достаточной для того, чтобы удовлетворить ее энергетические потребности в данный момент.

Рис. 13-10. Пространственное разделение противоположно направленных метаболических путей. Окисление жирных кислот происходит в основном в митохондриях, между тем как их синтез, для которого требуется восстановительная способность, протекает в цитозоле.

13.8. Энергия передается от катаболических реакций к анаболическим при помощи ATP

Выше мы в общих чертах познакомились с тем, как органические питательные вещества претерпевают в процессе метаболизма ряд превращений под действием ферментов. Попробуем теперь проследить, как происходят превращения энергии. Сложные пищевые молекулы, например глюкоза, обладают значительным запасом потенциальной энергии именно в силу сложности своей структуры. При распаде глюкозы в процессе окисления до простых и сравнительно небольших

молекул, CO_2 и H_2O, выделяется значительное количество свободной энергии. *Свободная энергия* – это та форма энергии, которая может использоваться для выполнения работы при постоянной температуре и постоянном давлении. Однако если свободная энергия, выделяющаяся при окислении глюкозы, не будет каким-либо способом улавливаться и сохраняться, то она попросту перейдет в тепло. Тепловая же энергия, хотя она и необходима для поддержания температуры тела у высших животных, не может использоваться ни для механической работы мышечного сокращения, ни для химической работы биосинтеза. Тепло может производить работу при постоянном давлении лишь в том случае, если оно передается от более нагретого тела к менее нагретому. В живых клетках это невозможно, поскольку они *изотермичны*, т. е. в любой их части поддерживается одна и та же температура. В клетках значительная часть свободной энергии, выделяющейся при катаболизме глюкозы и другого клеточного топлива, сохраняется благодаря сопряженному синтезу *аденозинтрифосфата* (ATP) из *аденозиндифосфата* (ADP) (рис. 13-11) и *неорганического фосфата* (P_i). ATP, ADP и фосфат присутствуют во всех живых клетках и составляют универсальную систему,

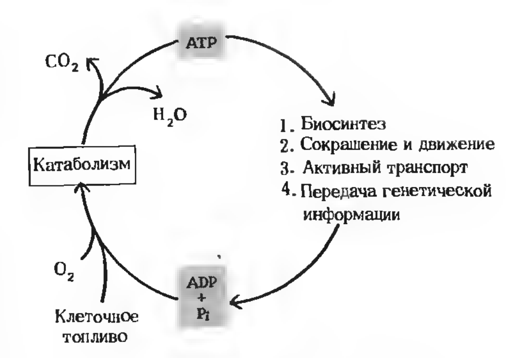


Рис. 13-12. Процессы жизнедеятельности, требующие затраты энергии, получают эту энергию от ATP, распадающегося при этом на ADP и неорганический фосфат. Для последующей регенерации ATP используется энергия, выделяющаяся в процессе катаболизма из клеточного топлива.

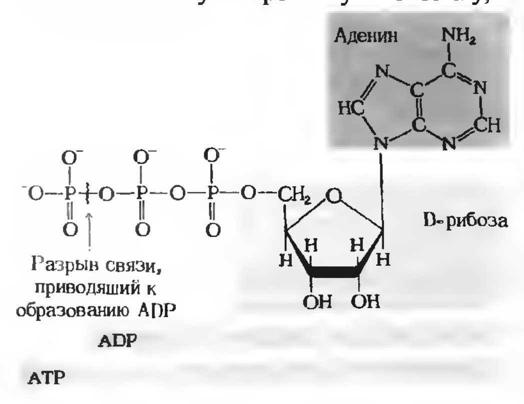


Рис. 13-11. Аденозинтрифосфат (ATP) в ионизированной форме при pH 7,0. Молекула аденозиндифосфата (ADP) содержит только две фосфатные группы. В качестве органических строительных блоков в молекулу ATP входят пуриновое основание аденин и сахар D-рибоза (см. гл. 14).

служащую для переноса энергии. Химическая энергия, запасенная в форме ATP, способна производить работу четырех разных видов (рис. 13-12). 1. ATP поставляет энергию для химической работы биосинтеза. В этом процессе на молекулы-предшественники, или строительные блоки, переносится – под действием соответствующего фермента – концевая фосфатная группа ATP. В результате строительные блоки «активируются» и в таком активированном виде используются для сборки макромолекул. 2. ATP служит источником энергии для процессов движения и сокращения. 3. За счет энергии ATP происходит перенос питательных веществ через мембраны против градиента концентрации. 4. Энергия ATP используется в очень тонких механизмах, обеспечивающих передачу генетической информации при биосинтезе ДНК, РНК и белков; сама информация есть, в сущности, одна из форм энергии. Во всех тех случаях, когда энергия ATP используется для производства работы, концевая фосфатная группа ATP отщепляется (рис. 13-11) в виде неорганического фосфата и остается ADP – «разряженная форма» этой системы переноса энергии. ADP может быть затем вновь «заряжен» путем присоединения фосфатной группы (что приводит к регенерации ATP) в реакциях, сопряженных с расщеплением клеточного

топлива, т.е. с процессом, поставляющим энергию. В клетках, следовательно, совершается круговорот энергии. АТР в этом круговороте играет роль переносчика энергии и служит звеном, связывающим между собой процессы, идущие с выделением и с потреблением энергии.

13.9. NADPH переносит энергию в форме восстановительной способности

Существует и другой путь передачи энергии от катаболических реакций к биосинтетическим, для которых необходима энергия. В этом случае передача совершается через водородные атомы или электроны. При образовании глюкозы из CO_2 в процессе фотосинтеза и при синтезе жирных кислот из ацетата, протекающем в печени животных, восстановительная способность в форме водородных атомов требуется для восстановления двойных связей. Чтобы быть достаточно мощными восстановителями, атомы водорода должны обладать значительным запасом свободной энергии. Такие богатые энергией водородные атомы образуются из клеточного топлива под действием дегидрогеназ. Дегидрогеназы отщепляют водородные атомы от молекул клеточного топлива и переносят их на особые коферменты, в частности на окисленную форму

Восстановленная форма

Окисленная форма

Рис. 13-13. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат в восстановленной форме (NADPH). На красном фоне показано никотинамидное кольцо, несущее богатый энергией водородный атом и электроны. Справа никотинамидная часть молекулы показана в окисленной форме.

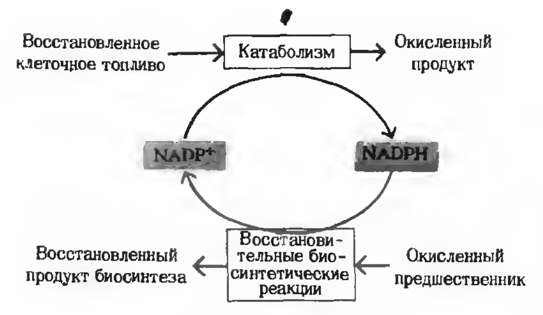


Рис. 13-14. Цикл $NADP^+ \rightleftharpoons NADPH$, при помощи которого совершается передача восстановительной способности от катаболических реакций к анаболическим.

никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($NADP^+$) (рис. 13-13). Восстановленная форма этого кофермента (NADPH) переносит богатые энергией электроны от катаболических реакций к биосинтетическим (рис. 13-14), подобно тому как АТР переносит высокоэнергетические фосфатные группы.

13.10. Клеточный метаболизм – это экономичный, строго регулируемый процесс

Клеточный метаболизм основан на принципе максимальной экономии. Общая скорость катаболизма, обеспечивающего клетку энергией, определяется не просто наличием или концентрацией клеточного топлива; она обусловлена потребностью клетки в энергии в форме АТР и NADPH. Клетка потребляет в каждый данный момент как раз такое количество питательных веществ, какое позволяет ей удовлетворять свои энергетические нужды. Точно так же обусловлена потребностями данного момента скорость синтеза строительных блоков и макромолекул клетки. В растущих клетках, например, все 20 видов аминокислот синтезируются как раз с такой скоростью и в таких соотношениях, какие необходимы для того, чтобы обеспечить сборку новых белков, требующихся в данный момент. Таким образом, ни одна из 20 аминокислот не вырабатывается в избытке и не остается без использования. У многих животных и растений в организме откладываются запасные питательные вещества, способные служить источником энергии и углерода. Такими запасными питательными веществами являются, в частности, жиры и углеводы.

Что же касается белков, нуклеиновых кислот или простых биомолекул, играющих роль строительных блоков, то они обычно не откладываются в запас и вырабатываются лишь тогда, когда они нужны, и в тех количествах, какие необходимы. Из этого правила есть, однако, исключение: в семенах растений и яйцеклетках животных часто содержатся большие количества запасных белков, которые служат источником аминокислот во время развития зародыша.

Катаболические процессы отличаются высокой чувствительностью и очень чутко реагируют на любые изменения в энергетических потребностях клетки. У комнатной мухи, например, расход кислорода и потребление клеточного топлива в полете менее чем за секунду увеличиваются примерно в 100 раз из-за резко возросшей потребности в АТР, который расходуется летательными мышцами. Этот пример показывает, что регуляторные механизмы центральных метаболических путей и в первую очередь тех, которые обеспечивают клетку энергией в форме АТР, весьма чувствительны и способны очень быстро удовлетворять меняющиеся метаболические потребности клетки.

13.11. Регуляция метаболических путей осуществляется на трех уровнях

В регуляции метаболических путей участвуют механизмы трех типов. Первый из них, наиболее быстро реагирующий на любое изменение ситуации, связан с действием аллостерических ферментов (рис. 13-15), каталитическая активность которых может меняться под

влиянием особых веществ, оказывающих стимулирующее или тормозящее действие (их называют эффекторами или модуляторами; разд. 9.18). Как правило, аллостерические ферменты занимают место в начале или поблизости от начала данной мультиферментной последовательности и катализируют ту ее стадию, которая лимитирует скорость всего процесса в целом; обычно роль такой стадии играет практически необратимая реакция. В катаболических процессах, сопровождающихся синтезом ATP из ADP, в роли аллостерического ингибитора одной из ранних стадий катаболизма часто выступает именно этот конечный продукт – ATP. Аллостерическим ингибитором одной из ранних стадий анаболизма нередко служит конечный продукт биосинтеза, например какая-нибудь аминокислота (разд. 9.18). Активность некоторых аллостерических ферментов стимулируется специфическими положительными модуляторами. Аллостерический фермент, регулирующий одну из катаболических последовательностей реакций, может, например, подчиняться стимулирующему влиянию положительных модуляторов – ADP или AMP и ингибирующему действию отрицательного модулятора – ATP. Известны также случаи, когда аллостерический фермент какого-нибудь метаболического пути специфическим образом реагирует на промежуточные или конечные продукты других метаболических путей. Благодаря этому оказывается возможной координация скорости действия различных ферментных систем.

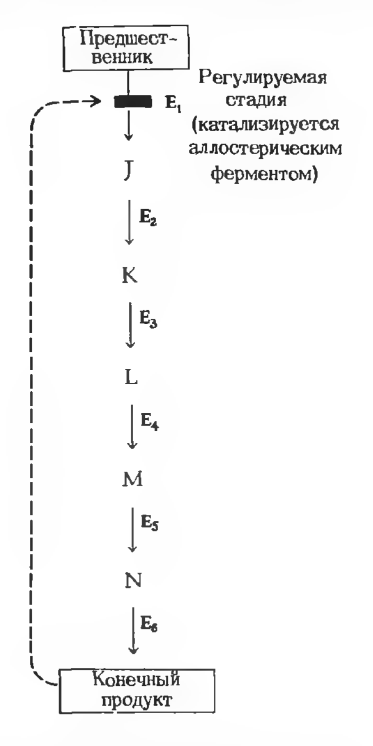
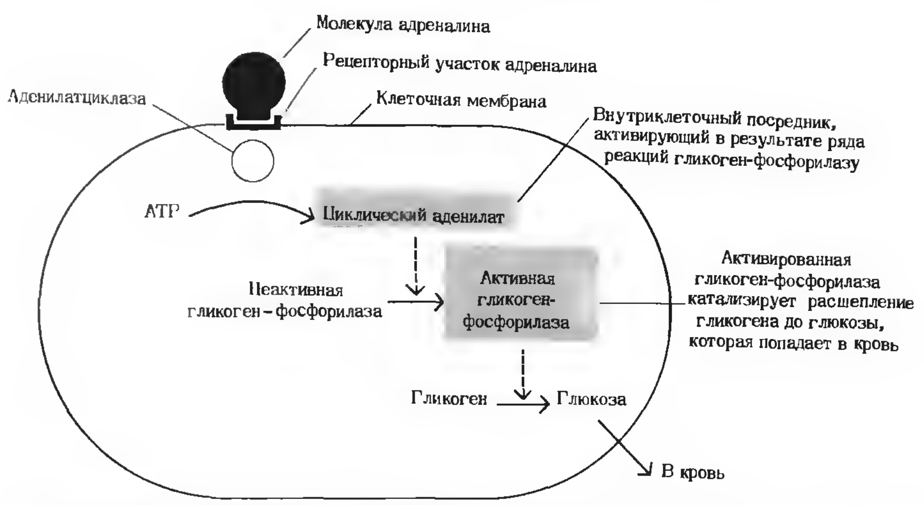


Рис. 13-15. Регуляция катаболического пути по типу обратной связи, т.е. за счет ингибирования аллостерического фермента конечным продуктом данного процесса. Буквами J, K, L и т.д. обозначены промежуточные продукты данного метаболического пути, а буквами E_1, E_2, E_3 и т.д. – ферменты, катализирующие отдельные стадии. Первая стадия катализируется аллостерическим ферментом (E_1), который ингибируется конечным продуктом данной последовательности реакций. Аллостерическое ингибирование показано прерывистой красной стрелкой, которая соединяет ингибирующий метаболит с реакцией, катализируемой аллостерическим ферментом. Регулируемая стадия (катализируемая ферментом E_1) в условиях клетки обычно представляет собой практически необратимую реакцию.

Второй тип механизмов, регулирующих метаболизм у высших организмов, – это *гормональная регуляция* (рис. 13-16). Гормонами называют особые химические вещества (химические «посредники»), вырабатываемые различными эндокринными железами и выделяемые непосредственно в кровь; они переносятся кровью к другим тканям или органам и здесь стимулируют или тормозят определенные виды метаболической активности. Гормон *адреналин*, например, секретируется мозговым веществом надпочечника и переносится кровью в печень, где он стимулирует распад гликогена до глюкозы, что вызывает повышение уровня сахара в крови. Кроме того, адреналин стимулирует распад гликогена в скелетных мышцах; этот процесс приводит к образованию лактата и к запасанию энергии в форме ATP. Адреналин вызывает эти эффекты, присоединяясь к особым *рецепторным участкам* на поверхности мышечных клеток или клеток печени. Связывание адреналина служит сигналом; этот сигнал передается



во внутренние отделы клетки и вызывает здесь ковалентную модификацию, под влиянием которой *гликоген-фосфорилаза* (первый фермент в системе, катализирующей превращение гликогена в глюкозу и другие продукты; разд. 9.22) переходит из менее активной формы в более активную (рис. 13-16).

Рис. 13-16. Гормональная регуляция ферментативной реакции. В результате присоединения гормона адреналина к специфическим рецепторам, находящимся на поверхности клеток печени, образуется при участии связанного с мембраной фермента (аденилатциклазы) циклический аденилат. Последний функционирует как аллостерический активатор, или внутриклеточный посредник, под действием которого гликоген-фосфорилаза переходит из неактивной формы в активную, что влечет за собой ускорение превращения гликогена печени в глюкозу крови. Подробно этот метаболический путь описан в гл. 25.

Третий тип механизмов, регулирующих метаболизм, связан с изменением *концентрации* данного фермента в клетке. Концентрация всякого фермента в любой данный момент определяется соотношением скоростей его синтеза и распада. Скорость синтеза некоторых ферментов при определенных условиях резко возрастает; соответственно увеличивается и концентрация данного фермента в клетке. Если, например, животное получает рацион, богатый углеводами, но бедный белком, то в печени у него оказывается крайне низким содержание ферментов, катализирующих в обычных условиях распад аминокислот до ацетил-СоА. Поскольку при таком рационе эти ферменты практически не нужны, они и не вырабатываются в больших количествах. Стоит, однако, перевести животное на рацион, богатый белком, и уже через сутки в его печени заметно повысится содержание ферментов, которые потребуются теперь для расщепления перевариваемых аминокислот. Клетки печени, следовательно, обладают способностью включать или выключать биосинтез спе-

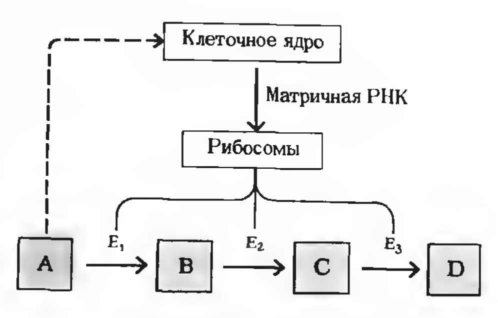


Рис. 13-17. Индукция ферментов. Высокая внутриклеточная концентрация субстрата А может стимулировать биосинтез ферментов E_1, E_2 и E_3. Содержание этих ферментов в клетке возрастает, и тем самым создается возможность для ускорения тех реакций, в результате которых избыток субстрата А удаляется. Избыток субстрата А служит, следовательно, для клеточного ядра сигналом, вынуждающим его «включить» гены, контролирующие образование ферментов E_1, E_2 и E_3. Включение генов означает синтез соответствующей матричной РНК; она поступает в рибосомы, и вследствие этого в них осуществляется синтез ферментов E_1, E_2 и E_3.

цифичных ферментов в зависимости от природы поступающих в них питательных веществ. Это явление носит название *индукции ферментов* (рис. 13-17).

13.12. Вторичный метаболизм

До сих пор речь шла у нас главным образом о *центральных* метаболических путях, т. е. о *путях превращения основных пищевых веществ* клетки – углеводов, жиров и белков. На этих центральных путях потоки метаболитов довольно внушительны. Например, в организме взрослого человека ежесуточно окисляется до CO_2 и воды несколько сотен граммов глюкозы. Есть, однако, и другие метаболические пути со значительно меньшим потоком метаболитов; ежесуточный синтез или распад измеряется здесь миллиграммами. Эти пути составляют так называемый *вторичный метаболизм*, роль которого состоит в образовании различных специализированных веществ, требующихся клеткам в малых количествах. К вторичным метаболическим путям принадлежит, например, биосинтез коферментов и гормонов, потому что эти соединения вырабатываются и используются только в следовых количествах. Сотни различных высокоспециализированных биомолекул, в том числе нуклеотиды, пигменты, токсины, антибиотики и алкалоиды, продуцируются у разных форм жизни на вторичных метаболических путях. Все эти продукты, разумеется, очень важны для тех организмов, которые их вырабатывают, и все они выполняют какие-то определенные биологические функции. Однако специализированные вторичные метаболические пути, ведущие к их синтезу, не во всех случаях хорошо изучены. В этой книге мы лишены возможности рассматривать эти вторичные метаболические пути, порой весьма сложные; мы здесь займемся главным образом *центральными*, или *первичными*, путями метаболизма.

13.13. Метаболические пути могут быть идентифицированы в прямых опытах

Для того чтобы выявить последовательность химических реакций, составляющих тот или иной метаболический путь, можно воспользоваться тремя главными экспериментальными подходами. Первый из них, наиболее прямой, заключается в изучении метаболического пути in vitro (в пробирке), т. е. не в самой живой ткани, а в ее бесклеточном экстракте, сохраняющем способность катализировать весь исследуемый процесс в целом. Еще в середине прошлого века стало, например, известно, что дрожжи сбраживают глюкозу до этилового спирта и CO_2. Однако изучение отдельных стадий этого метаболического пути, поставляющего анаэробным дрожжевым клеткам почти всю необходимую им энергию, началось по-настоящему только с 1898 г., когда Эдуард Бухнер обнаружил, что отжатый из дрожжей сок, не содержащий живых клеток, тоже способен сбраживать глюкозу до этилового спирта и CO_2 (разд. 9.1). Позже выяснилось, что брожение в таких экстрактах происходит лишь при добавлении неорганического фосфата и что по мере потребления глюкозы этот фосфат исчезает из экстракта. Оказалось, что в среде накапливается при этом какое-то фосфорилированное производное гексозы, обладающее всеми теми свойствами, какими должен обладать один из промежуточных продуктов на пути превращения глюкозы в этиловый спирт и CO_2. После того как этот промежуточный продукт был идентифицирован, в дрожжевом экстракте удалось обнаружить фермент, превращающий его в другой продукт. Этот последний в свою очередь был выделен и идентифицирован. Таким образом, идентифицированными оказались уже два промежуточных продукта расщепления глюкозы. Добавляя к экстрактам ингибиторы ферментов, исследователи добивались накопления других промежуточных продуктов. В конце концов благодаря комбинированию такого рода приемов удалось выделить и идентифи-

цировать 11 метаболитов, представляющих собой промежуточные продукты спиртового брожения глюкозы. Все 11 ферментов, катализирующих эту последовательность реакций, были выделены и очищены. Этот же прямой метод применяется и при изучении других метаболических путей. Он позволяет идентифицировать один за другим промежуточные продукты данного процесса и ферменты, катализирующие их образование и распад. После выявления всей последовательности реакций процесс может быть воспроизведен в пробирке с использованием очищенных компонентов.

13.14. Промежуточные стадии метаболизма можно выявлять с помощью мутантных организмов

Второй важный подход к выяснению метаболических путей связан с изучением мутантных организмов, не способных синтезировать данный фермент в активной форме. Такой дефект, если только он не является летальным, может проявиться в том, что у мутанта будет накапливаться и выводиться из организма субстрат дефектного фермента. Некоторые этапы обмена аминокислот удалось, например, выяснить, исследуя у людей врожденные нарушения обмена, при которых в организме не вырабатывается определенный фермент (рис. 13-18). У человека такие генетические нарушения встречаются сравнительно редко и вследствие этого не могут служить объектом систематического изучения. Однако у микроорганизмов их можно вызвать искусственно, воздействуя на клетки различными мутагенными агентами (рентгеновскими лучами или определенными химическими соединениями), способными изменять структуру определенных генов в их ДНК. Полученные таким путем мутантные микроорганизмы, утратившие способность синтезировать тот или иной фермент, могут служить прекрасным орудием для изучения метаболизма.

Познакомимся теперь с тем, как используются такие мутанты. Нормальные, т. е. немутантные клетки хлебной



Рис. 13-18. Случаи генетического нарушения обмена аминокислоты фенилаланина, наблюдавшиеся у человека. Каждый из таких случаев связан с выпадением функции одного-единственного гена. Изучение этих нарушений дало возможность установить природу промежуточных продуктов обмена фенилаланина.

плесени *Neurospora crassa* (рис. 13-19), могут расти на простой среде, содержащей в качестве единственного источника углерода глюкозу и единственного источника азота – аммиак. Однако если споры этого гриба подвергнуть рентгеновскому облучению, то среди возникших мутантов обнаружатся и такие, которые уже не способны расти на этой простой среде, но вполне нормально растут на среде, содержащей определенные метаболиты. Так, например, некоторые мутанты *Neurospora* нормально развиваются на среде, содержащей аминокислоту аргинин, которая немутантным клеткам не требуется. Ясно, что у таких мутантов не активен или вообще не вырабатывается какой-то из ферментов, участвующих в синтезе аргинина из аммиака. Из-за отсутствия аргинина мутантные клетки не в состоянии образовать белки, в состав которых входит аргинин, и потому не растут. Однако они будут нормально расти, если мы добавим к питательной среде помимо глюкозы и аммиака еще и аргинин. Такие мутанты с нарушением какого-либо био-



Рис. 13-19. Вегетативная форма, или мицелий, хлебной плесени *Neurospora crassa*. У этого организма легко получить мутантные штаммы, которые оказались весьма полезным инструментом при изучении некоторых метаболических путей. На основании экспериментов с мутантами *Neurospora* была сформулирована гипотеза «один ген – один фермент».

синтетического пути, рост которых можно восстановить, обеспечив их нормальным продуктом данного процесса, называют *ауксотрофными мутантами* (от греч. «aukso» – повышать; имеются в виду повышенные пищевые потребности этих мутантов).

Не все мутанты *Neurospora*, утратившие способность синтезировать аргинин, одинаковы; они различаются в зависимости от того, какая стадия биосинтеза аргинина у них нарушена (рис. 13-20). Набор различных мутантов, нуждающихся в аргинине, можно использовать для выявления промежуточных стадий в последовательности ферментативных реакций, из которых слагается синтез этой аминокислоты. Если мутант I (рис. 13-20) выращивать на среде с очень небольшим (лимитирующим) количеством аргинина, то клетки растут до тех пор, пока весь имеющийся аргинин не будет израсходован на синтез белка. Одновременно в культуральной среде накапливается предшественник D, который не может превратиться в аргинин, поскольку у му-

$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} Arg$ Дикий тип

$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D$ —| E_4 Arg Мутант I, которому для роста требуется Arg

$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C$ —| E_3 $D \xrightarrow{E_4} Arg$ Мутант II, которому для роста требуется D или Arg

$A \xrightarrow{E_1} B$ —| E_2 $C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} Arg$ Мутант III, которому для роста требуется C, D или Arg

Рис. 13-20. Ауксотрофные мутанты *Neurospora crassa*, утратившие в результате мутации способность синтезировать один из ферментов (отмечен на рисунке красной полосой), участвующих в биосинтезе аргинина (Arg) из предшественника A. Вещества B, C и D играют роль промежуточных продуктов в этом превращении. У мутанта I отсутствует фермент E_4, но его можно выращивать на среде, обогащенной аргинином. В этих условиях в культуральной среде будет накапливаться промежуточный продукт D. У мутанта II отсутствует фермент E_3, однако активность E_4 у него сохраняется. Поэтому он может расти, если добавить к среде либо аргинин, либо промежуточный продукт D, вырабатываемый мутантом I. Аналогичным образом мутант III, лишенный фермента E_2, растет на среде, содержащей C, D или аргинин, поскольку он может превращать в аргинин промежуточные продукты C или D.

танта I блокирована именно та ферментативная реакция, в результате которой происходит это превращение. Удалим теперь фильтрованием из культуральной среды клетки мутанта I и поместим в нее клетки мутанта II, тоже нуждающегося в аргинине, но уже по другой причине – из-за неспособности синтезировать промежуточный продукт D. Культуральная среда от мутанта I будет, очевидно, поддерживать рост мутанта II, потому что в ней присутствует предшественник D. Однако отфильтрованная культуральная среда мутанта II не должна поддерживать рост мутанта I. Мы можем поэтому определить предшественник, накапливающийся у мутанта I, по скорости роста мутанта II. Именно этим путем удалось в конечном счете идентифицировать все четыре предшественника аргинина – A, B, C и D. В подобных экспериментах по перекрестному питанию с использованием ауксотрофных мутантов *Neurospora crassa* или *Escherichia coli* были выяснены пути биосинтеза многих аминокислот.

13.15. Включение изотопной метки – весьма эффективный метод изучения метаболизма

Еще один мощный метод, дающий возможность проследить в общих чертах данный метаболический путь, основан на применении изотопов определенных элементов, вводимых в качестве метки в тот или иной метаболит (табл. 13-1). Так, в органические молекулы в качестве метки часто вводят атом радиоактивного изотопа углерода ^{14}C (средняя масса атома углерода равна 12,01). Меченая молекула в химическом отношении не отличима от нормальной, т. е. немеченой, молекулы, но благодаря радиоактивности ее можно легко обнаружить и проследить за ее судьбой. Можно, например, с этой целью синтезировать уксусную кислоту, у которой углерод карбоксильной группы будет обогащен радиоактивным изотопом ^{14}C. В норме этот изотоп присутствует в углеродных соединениях биосферы и геосферы в крайне малых и неизменных концентрациях. Скармливая животному ^{14}C-ацетат, можно проследить метаболическую судьбу этого соединения. При этом мы убедимся, например, что выдыхаемая животным CO_2 содержит ^{14}C, и это покажет нам, что некоторая часть ацетата претерпевает такие метаболические превращения, в процессе которых углерод его карбоксильной группы включается в состав CO_2. Если выделить затем у животного из липидов печени пальмитиновую кислоту, то и в ней обнаружится ^{14}C; следователь-

Таблица 13-1. Некоторые изотопы, используемые в качестве метки

Элемент	Средняя атомная масса	Изотоп, используемый в качестве метки	Тип изотопа	Период полураспада
H	1,01	^{2}H	Стабильный	
		^{3}H	Радиоактивный	12,1 года
C	12,01	^{13}C	Стабильный	
		^{14}C	Радиоактивный	5700 лет
N	14,01	^{15}N	Стабильный	
O	16,00	^{18}O	»	
Na	22,99	^{24}Na	Радиоактивный	15 ч
P	30,97	^{32}P	»	14,3 сут
S	32,06	^{35}S	»	87,1 сут
K	39,10	^{42}K	»	12,5 ч
Fe	55,85	^{59}Fe	»	45 сут
I	126,90	^{131}I	»	8 сут

Ацетат, меченный по углероду карбоксильной группы (выделен красным)

Скармливается крысам; из липидов печени этих крыс выделяют пальмитиновую кислоту

Рис. 13-21. Применение радиоактивного изотопа углерода для прослеживания метаболической судьбы углеродного атома карбоксильной группы ацетата. Значительная часть радиоактивного углерода меченого ацетата обнаруживается в выдыхаемой CO_2, однако довольно большое его количество попадает также в пальмитиновую кислоту липидов печени. В молекуле пальмитиновой кислоты мечеными оказываются только нечетные атомы углерода (считая от карбоксильной группы; обозначены красным цветом), т. е. данный эксперимент свидетельствует о том, что пальмитиновая кислота образуется в результате соединения восьми молекул ацетата по способу «голова–хвост».

но, карбоксильный углерод ацетата является биосинтетическим предшественником пальмитиновой кислоты. В опытах с химическим расщеплением такой пальмитиновой кислоты выяснилось также, что избыток ^{14}C характерен не для всех положений атомов углерода в ее молекуле, а только для положений через один углеродный атом, считая от карбоксильной группы (рис. 13-21). Если же скармливать животному ацетат, меченный ^{14}C только по метильной группе, то мечеными в молекуле пальмитиновой кислоты снова окажутся чередующиеся углеродные атомы, но на этот раз считая от α-углерода, или С-2. Эти наблюдения позволили сделать вывод, что все углеродные атомы пальмитиновой кислоты ведут свое происхождение от молекул ацетата и что при синтезе пальмитиновой кислоты углеродные скелеты ацетатных молекул соединяются по типу «голова–хвост».

Метод изотопных меток применяется и для определения скорости обменных процессов в целом организме. Одним из самых важных результатов, которые удалось получить с помощью этого очень мощного метода, является открытие того факта, что макромолекулярные компоненты клеток и тканей подвергаются непрерывному *метаболическому обновлению*; иными словами, содержание этих компонентов в клетке в каждый данный момент носит динамический характер, т. е. является результатом непрерывно протекающих процессов их биосинтеза и распада, идущих с одинаковой скоростью. Методом изотопных меток было, например, установлено, что время полужизни белков печени крысы равно 5–6 дням (табл. 13-2). В то же время показано, что обновление белков скелетных мышц или мозга происходит гораздо медленнее.

Именно методу изотопных меток мы обязаны целым рядом крайне важных наблюдений, касающихся метаболизма.

Таблица 13-2. Метаболическое обновление некоторых компонентов тканей крысы (по данным одного из ранних исследований с радиоактивным углеродом)

Ткань	Время полужизни, сут
Печень	
Общий белок	5,0–6,0
Гликоген	0,5–1,0
Фосфоацилглицеролы	1–2
Триацилглицеролы	1–2
Холестерол	5–7
Митохондриальные белки	9,7
Мышцы	
Общий белок	~ 50
Гликоген	0,5–1,0
Мозг	
Триацилглицеролы	10–15
Фосфолипиды	200
Холестерол	> 100

13.16. Различные метаболические пути могут быть локализованы в разных участках клетки

В гл. 1 мы уже говорили о том, что есть два больших класса клеток – прокариотические и эукариотические. Представители этих двух классов сильно различаются по размерам, по своей внутренней структуре, а также по генетической и метаболической организации. Прокариотические клетки, к которым принадлежат бактерии и сине-зеленые водоросли (цианобактерии),– это очень мелкие клетки, сравнительно простого строения, с одной-единственной мембранной системой, а именно мембраной, окружающей клетку.

В прокариотических клетках нет отсеков, или компартментов, разделенных внутренними мембранами. Однако и у бактерий обнаруживается известная компартментализация некоторых ферментных систем (рис. 13-22). Так, большинство ферментов, участвующих в биосинтезе белка, локализуется у них в рибосомах, а некоторые ферменты биосинтеза фосфолипидов сосредоточены в клеточной мембране.

Эукариотические клетки, к которым относятся клетки высших животных и растений, грибов, высших водорослей и простейших, значительно крупнее прокариотических и гораздо более сложно устроены (рис. 13-23). Помимо клеточной, или плазматической, мембраны в них имеется еще и окруженное мембраной ядро, в котором находятся хромосомы (число их у разных организмов различно; у некоторых оно весьма велико). Есть и другие мембранные органеллы, а именно *митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, хлоропласты* клеток зеленых растений. В эукариотических клетках ферменты тех или иных метаболических путей часто локализуются в особых органеллах или компартментах. Каким образом это стало известно? Клеточные органеллы можно выделить из клеток и тканей центрифугированием (рис. 13-24). Для этого животные или растительные ткани сначала подвергают щадящей гомогенизации в изотоническом растворе сахарозы. Плазматическая мембрана при таком воздействии разрушается, а различные клеточные органеллы по большей части остаются неповрежденными. Сахароза удобна тем, что она сравнительно трудно проходит сквозь мембраны и потому не вызывает набухания таких внутриклеточных структур, как митохондрии или хлоропласты. Разные виды органелл, например ядра и митохондрии, различающиеся по своим размерам и по удельному весу, а значит, и оседающие в поле центробежных сил с разной скоростью, могут быть выделены после этого из гомогената *дифференциальным центрифугированием* (рис. 13-24). Затем эти ядра, митохондрии и прочие выделенные фракции исследуют на способность катализировать определенный метаболический процесс. Именно этот подход и дал возможность установить, что разные метаболические пути локализованы в эукариотических клетках раздельно (рис. 13-23). Выяснилось, например, что в некоторых клетках все ферменты, участвующие в превращении глюкозы в мо-

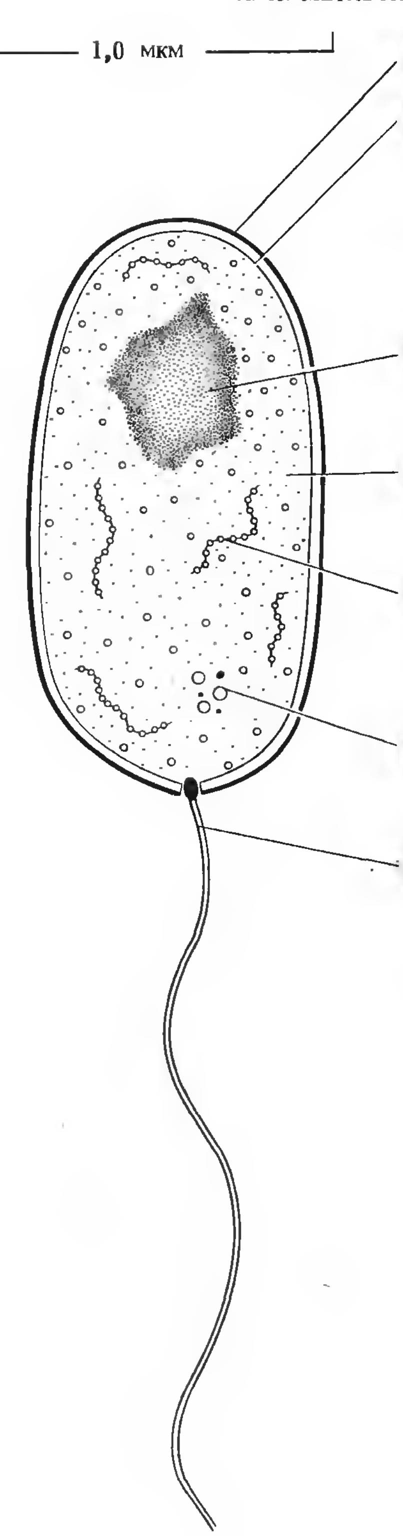


Рис. 13-22. Локализация некоторых видов метаболической активности в бактериальной клетке.

лочную кислоту, находятся в *цитозоле*, т.е. в растворимой части цитоплазмы, тогда как ферменты цикла лимонной кислоты, переноса электронов и окислительного фосфорилирования локализованы в *митохондриях*.

Краткое содержание главы

Организмы можно классифицировать исходя из их потребности в тех или иных источниках углерода. Автотрофам достаточно двуокиси углерода, а гетеротрофы

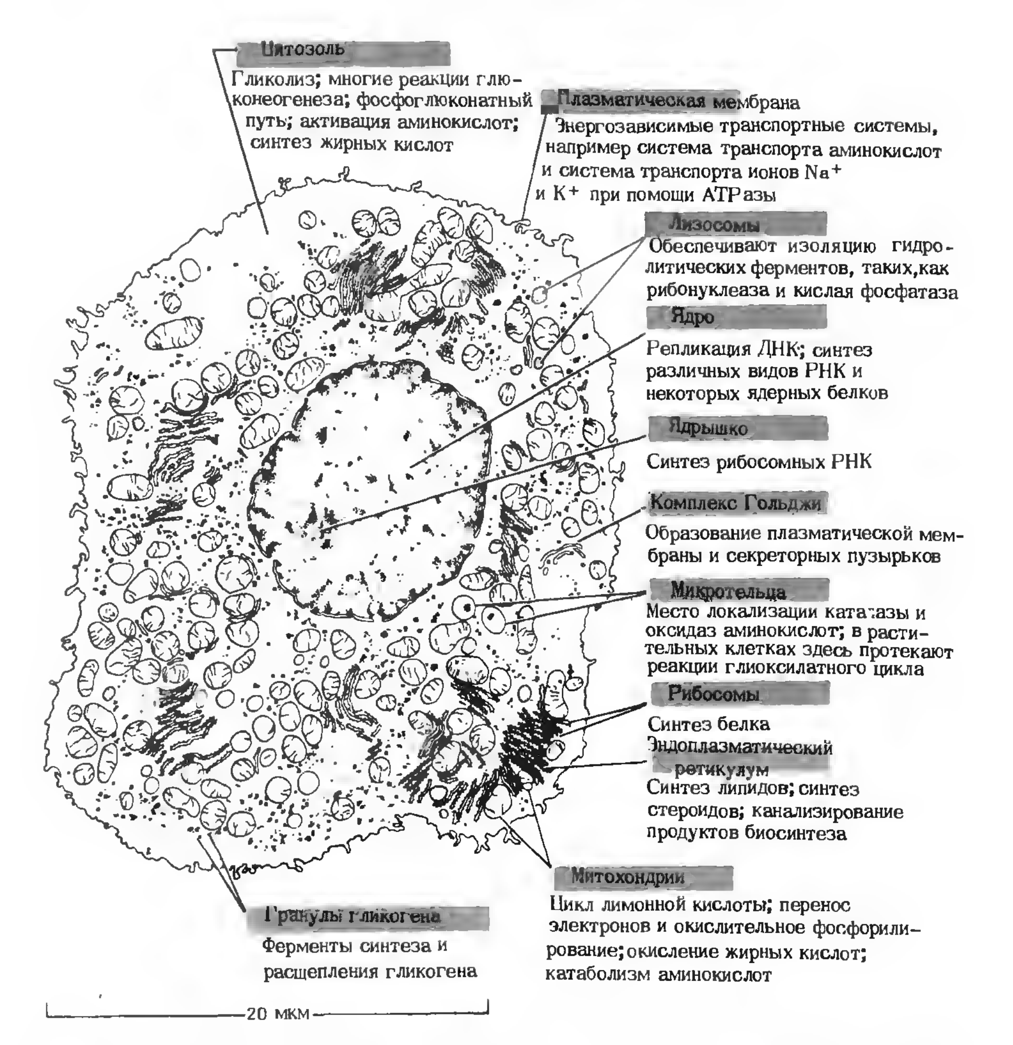


Рис. 13-23. Компартментализация некоторых важных ферментов и метаболических путей в клетке печени крысы. Электронная микрофотография, на основе которой выполнен этот рисунок, приведена в гл. 2 (см. рис. 2-7).

должны получать углерод в виде каких-нибудь восстановленных органических соединений, таких, как глюкоза. Для многих автотрофных клеток, например для клеток зеленых растений, источником энергии служит солнечный свет; гетеротрофы получают необходимую им энергию в результате окисления органических пищевых веществ.

Метаболизм включает в себя катаболизм, или расщепление пищевых веществ, богатых энергией, и анаболизм, или биосинтез новых клеточных компонентов. В катаболических и анаболических процессах различают три главные стадии. На первой стадии катаболизма полисахариды, жиры и белки расщепляются под действием ферментов до своих строительных блоков, на второй стадии происходит окисление этих строительных блоков, в результате которого в качестве главного продукта образуется ацетил-СоА, а на третьей стадии ацетильная группа ацетил-СоА окисляется до CO_2. Различные катаболические пути сливаются в один общий конечный путь, анаболические же пути расходятся, так что из небольшого числа предшественников образуется в конечном счете много



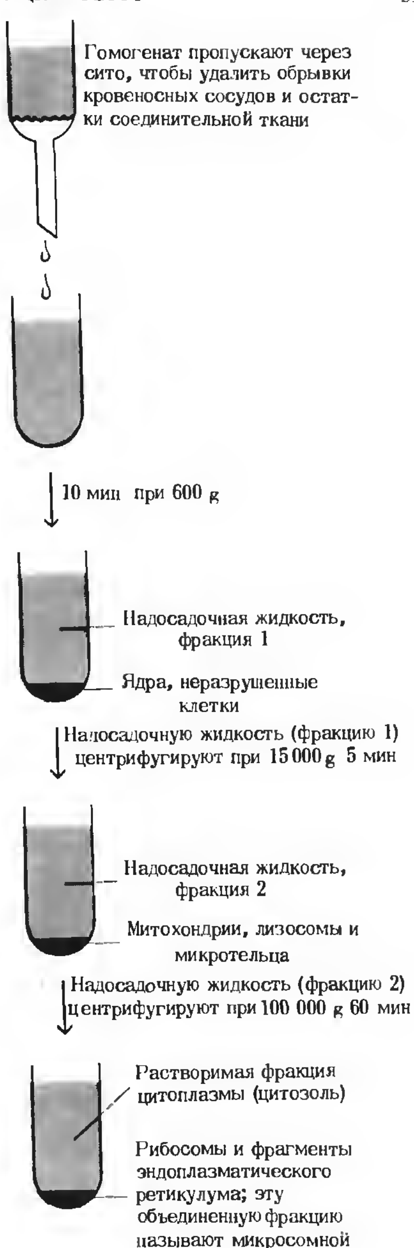


Рис. 13-24. Фракционирование клеточного экстракта методом дифференциального центрифугирования. Клеточная мембрана разрушается силами трения в гомогенизаторе с вращающимся поршнем. После удаления остатков соединительной ткани и обрывков кровеносных сосудов при помощи сита из нержавеющей стали клеточный экстракт центрифугируют несколько раз, постепенно увеличивая скорость вращения ротора.

различных продуктов. Соответствующие катаболические и анаболические пути неидентичны, т.е. отдельные их ферментативные этапы не совпадают; регулируются эти пути независимо; часто они локализованы в разных участках клетки. При распаде пищевых веществ часть высвобождающейся из них энергии запасается в форме аденозинтрифосфата (АТР). АТР служит переносчиком энергии от катаболических реакций к процессам, сопровождающимся потреблением энергии, таким, как биосинтез, сокращение или движение, перенос веществ через мембрану или передача генетической информации. Химическая энергия передается также от катаболических процессов к анаболическим в форме восстановительной способности – через восстановленный кофермент NADPH.

Регуляция метаболизма осуществляется на трех уровнях: 1) при помощи аллостерических ферментов, 2) при помощи гормонов и 3) путем регулирования синтеза ферментов. Для анализа метаболических путей применяют экстракты клеток и тканей, из которых выделяют ферменты изучаемого метаболического пути и его промежуточные продукты. Широкие возможности для изучения метаболизма открывает использование мутантных микроорганизмов с генетиче-

скими дефектами, затрагивающими тот или иной метаболический путь (ауксотрофных мутантов). Весьма эффективен в этом отношении также метод изотопных меток. В эукариотических клетках ферменты различных метаболических путей разделены пространственно, т.е. находятся в разных органеллах – в ядрах, митохондриях или эндоплазматическом ретикулуме; из этих органелл их можно выделять для прямого изучения.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Colowick S.P., Kaplan N.O. (eds.). Methods in Enzymology, Academic, New York, 1955. Многотомное издание, содержащее обзорные статьи по всем вопросам энзимологии и метаболизма, а также по методам исследований.

Dagley S., Nicholson D.E. Introduction to Metabolic Pathways, Wiley, New York, 1970. (Имеется перевод: Дэгли С., Николсон Д. Метаболические пути.– М.: Мир, 1973.) Сводка метаболических карт.

Roodyn D.B. (ed.). Subcellular Biochemistry, v. I–VII, Plenum, New York, 1972–1980. Многотомное издание, содержащее обзорные статьи по компартментализации различных видов биохимической активности в клетках.

Stanier R.Y., Doudoroff M., Adelberg E.A. The Microbial World, 4th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1976. (Имеется перевод: Стейниер Р. и др. Мир микробов. В трех томах.– М.: Мир, 1979.) Хороший учебник по общей микробиологии. Рассматриваются различные подгруппы автотрофных и гетеротрофных организмов; обсуждается существенный вклад микроорганизмов в общий обмен биомассы земного шара.

Статьи

Сентябрьский номер журнала «Scientific American» за 1970 г. (т. 223, № 3) целиком посвящен вопросам, касающимся биосферы. Особо можно рекомендовать следующие статьи, вошедшие в этот номер журнала:

Penman H.L. The Water Cycle, p. 98.

Cloud P., Gibor A. The Oxygen Cycle, p. 110.

Bolin B. The Carbon Cycle, p. 124.

Delwiche C.C. The Nitrogen Cycle, p. 136.

Brown L.R. Human Food Production as a Process in the Biosphere, p. 160.

Hall D.O. Photobiological Energy Conversion, FEBS Lett., **64**, 6–16 (1976). Общая статья, рассматривающая фотосинтез с точки зрения потребностей человека в пище и энергии.

Woodwell G.M. The Carbon Dioxide Question, Sci. Am., **238**, 34–43, January 1978. Обсуждаются возможные последствия повышения содержания CO_2 в атмосфере.

Вопросы и задачи

1. *Анализ метаболического пути.* Анализ любого метаболического пути напоминает подведение баланса в приходно-расходной книге. В такую книгу заносят все произведенные в течение месяца операции (в соответствующую главу «Приход» или «Расход»), а в конце месяца определяют итог. Метаболический путь – это тоже ряд «операций», ряд последовательных химических превращений, из которых в конечном счете и слагается данный метаболический процесс. Подобно бухгалтерским операциям, химические превращения тоже можно охарактеризовать количественно и каждое из них может быть описано уравнением химического баланса. В интактных клетках такой «учет» – далеко не простое дело, поскольку промежуточные продукты данного метаболического пути вовлекаются иногда в другие метаболические процессы. Ниже приведены реакции, из которых складывается процесс ферментативного превращения глицеральдегид-3-фосфата в этанол (спиртовое брожение) в дрожжевых клетках. Каждое из приведенных здесь химических уравнений сбалансировано. Следует, однако, иметь в виду, что в действительности реакции, из которых состоит данный метаболический путь, могут протекать и в иной последовательности.

   Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + NAD^+ → 3-фосфоглицероилфосфат + NADH + H^+

   Фосфоенолпируват + ADP → Пируват + + ATP

   Этанол + NAD^+ → Ацетальдегид + + NADH + H^+

   3-фосфоглицероилфосфат + ADP → → 3-фосфоглицерат + ATP

   2-фосфоглицерат ⇌ 3-фосфоглицерат

   2-фосфоглицерат → Фосфоенолпируват + + H_2O

   Пируват → CO_2 + Ацетальдегид

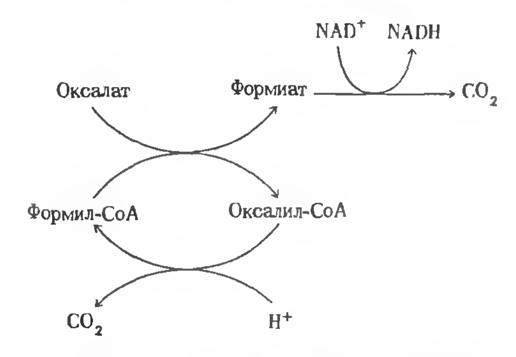
   а) Используя все эти уравнения, записанные в словесной форме, и зная химическую структуру каждого промежуточного продукта, выведите и запишите

последовательность химических превращений (метаболический путь), из которых состоит процесс расщепления глицеральдегид-3-фосфата до этанола.

б) Напишите суммарное уравнение этого процесса. Для этого вам придется поступить так, как если бы вы подбивали итог в приходно-расходной книге, т.е. суммировать все поступления и траты.

в) Изобразите данный метаболический путь так, как это сделано на рис. 13-4. Укажите, как связаны между собой отдельные части этого пути.

2. *Циклический метаболический путь.* Среди бактерий, принадлежащих к роду *Pseudomonas*, встречаются виды, способные использовать в качестве источника клеточного топлива оксалат ($^{-}OOC-COO^{-}$) - соединение, крайне токсичное для большинства млекопитающих. Обмен оксалата у таких бактерий идет по циклическому пути, который схематически можно представить следующим образом:



а) Изобразите данный метаболический путь в виде ряда уравнений химического баланса, в которых продукт одной реакции служит субстратом следующей. Напишите формулы соединений, участвующих в каждой из стадий.

б) Напишите сбалансированное суммарное уравнение процесса расщепления оксалата до CO_2, пользуясь структурными формулами.

3. *Включение ^{14}C в аминокислоты.* В 1955 г. Робертс и его сотрудники опубликовали результаты своих экспериментов по выращиванию *Escherichia coli* на среде, содержавшей в качестве единственного источника углерода равномерно меченную ^{14}C-глюкозу. Исследователи рассчитывали таким способом пометить радиоактивным углеродом биомолекулы клетки. Оказалось, что при выращивании бактерий на ^{14}C-глюкозе метка быстро включается во все аминокислоты. Если же в среду, содержащую ^{14}C-глюкозу, добавляли немеченый гистидин (так что источников углерода было уже два: глюкоза и гистидин), то ^{14}C включался во все аминокислоты, за исключением гистидина. Почему при отсутствии немеченого гистидина ^{14}C включался в эту аминокислоту? Почему в среде, содержавшей немеченый гистидин, метка в гистидин не включалась? Что происходило: ингибирование по типу обратной связи или репрессия ферментов?

4. *Регуляция обмена лактозы у E. coli.* Клетки E. coli можно выращивать на простой среде, содержащей в качестве единственного источника углерода лактозу. Необходимым этапом обмена лактозы (а следовательно, и необходимым условием выживания бактерий) является гидролиз лактозы до моносахаридов глюкозы и галактозы, катализируемый ферментом β-галактозидазой. Когда *E. coli* выращивают на среде с лактозой, в каждой бактериальной клетке присутствует несколько тысяч молекул этого фермента (см. задачу 1), способных осуществлять гидролиз. Однако если единственным источником углерода в среде служит глюкоза или, например, глицерол, то в клетках обнаруживается не более 5–10 молекул β-галактозидазы.

а) Каким образом регулируется обмен лактозы? Объясните.

б) Почему при замене в питательной среде лактозы на глицерол содержание β-галактозидазы в клетках снижается? Почему оно не остается на прежнем уровне?

в) Если среда содержит в качестве единственного источника углерода метил-β-галактозид, то клетки растут быстро и содержат тысячи молекул β-галактозидазы. Если же единственным источником углерода является метил-α-галактозид, то клетки растут медленно и содержат совсем мало β-галактозидазы. Объясните причины этих различий.

5. *Сравнение катаболических и анаболических путей.* Ниже на схеме изображено взаимопревращение глюкозы и фруктозо-1,6-дифосфата. В обмене углеводов эта последовательность реакций играет ключевую роль. Расщепление глюкозы представляет собой катаболический путь, а ее биосинтез из фруктозо-1,6-дифосфата – анаболический. Одни и те же гексозомонофосфаты служат промежуточными продуктами того и другого пути. Однако, хотя пути эти очень схожи, между ними есть явные различия. Выявите их.

Глюкоза
ATP → ADP; H_2O → P_i
Глюкозо-6-фосфат
Катаболический путь
Анаболический путь
Фруктозо-6-фосфат
ATP → ADP; H_2O → P_i
Фруктозо-1, 6-дифосфат

а) Напишите уравнения химического баланса для каждой из стадий катаболического пути. Напишите суммарное уравнение, представляющее собой результат сложения отдельных стадий.

б) Проделайте то же самое для анаболического пути.

в) Укажите различия между катаболическим и анаболическим путями, проявляющиеся в их суммарных уравнениях. Можно ли считать, что каждый из этих путей является простым обращением другого?

г) Чем обеспечивается направленность катаболизма глюкозы? Иными словами, что препятствует обращению этого процесса?

д) Возможно ли, чтобы один и тот же фермент катализировал и катаболическую, и анаболическую реакции взаимопревращения глюкозы и глюкозо-6-фосфата? Возможно ли это для взаимопревращения глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата?

6. *Измерение радиоактивности.* Количественное определение радиоактивных изотопов, обычно используемых в биологических исследованиях (^{3}H, ^{14}C, ^{32}P и ^{35}S), удобнее всего проводить при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика. За единицу радиоактивности (ее называют кюри, Ки; международное обозначение - Ci) принята активность, соответствующая $2{,}22 \cdot 10^{12}$ распадам в 1 минуту (расп./мин). При использовании жидкостного сцинтилляционного счетчика обычно удается зарегистрировать в виде импульсов только часть общего числа распадов. Поэтому количество радиоактивности часто выражают не в виде числа распадов в минуту (расп./мин), а в виде числа реально регистрируемых данным счетчиком импульсов в минуту (имп/мин). Если известна эффективность счета, которая определяется по формуле

$$\text{Эффективность счета} = \frac{\text{имп/мин}}{\text{расп./мин}} \cdot 100\%,$$

то на основании числа регистрируемых импульсов в минуту можно определить число распадов в минуту.

Использование радиоактивной метки – очень ценный метод биохимических исследований, потому что по радиоактивности мы можем судить о концентрации данного химического соединения. Под удельной радиоактивностью соединения понимают активность на единицу массы, объема и т. д. (грамм, моль, эквивалент, миллилитр и т. д.). Пользуясь этим понятием, мы вовсе не предполагаем, что метку несет каждая молекула данного соединения. Единственное, что требуется,–это чтобы регистрируемое счетчиком число импульсов было пропорционально концентрации меченого соединения; удельная радиоактивность и эффективность счета служат при этом пересчетными коэффициентами.

а) От поставщика получен препарат ^{14}C-глюкозы в 1 мл водного раствора. Общая радиоактивность препарата 250 мкКи, а его удельная радиоактивность 500 мКи/ммоль. Вычислите концентрацию глюкозы в полученной от поставщика 1-мл ампуле.

б) Сколько импульсов в минуту будет зарегистрировано, если из полученного раствора отобрать пробу (10 мкл), ввести ее в счетчик и измерить радиоактивность с эффективностью 70%?

7. *Измерение концентрации метионина внутри клетки.* Когда клетки *E. coli* выращивают на среде, в которой единственным источником серы служит $^{35}SO_4^{2-}$, все серусодержащие аминокислоты и белки содержат метку ^{35}S. В одном из таких экспериментов *E. coli* выращивали на среде, содержащей 0,85 мМ $^{35}SO_4^{2-}$. При измерении радиоактивности в 250-мкл пробе этой среды с 87%-ной эффективностью счета было зарегистрировано $4{,}50 \cdot 10^{5}$ имп/мин. По достижении максимального роста культуры клетки отфильтровали и промыли холодной водой. Свободные (несвязанные) аминокислоты экстрагировали из клеток кипящей водой и разделили методом ионообменной хроматографии. Экстракт из 1,85 г влажных клеток при измерении с 82%-ной эффективностью имел радиоактивность $3{,}2 \cdot 10^{5}$ имп/мин L-^{35}S-метионина. Вычислите концентрацию свободного L-метионина внутри клетки, исходя из предположения, что во влажных клетках 80% составляет вода и 20%–сухой остаток.

ГЛАВА 14

АТР-ЦИКЛ И БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ

В наши дни человек особенно остро ощущает, насколько энергия (т. е. способность производить работу) необходима для поддержания всей нашей современной цивилизации. Энергия требуется нам для производства различных товаров, для перевозки людей и материалов, для отопления жилых и рабочих помещений, а также для многих и многих других менее важных дел. Точно так же необходима энергия и микрокосмосу живой клетки. В живых клетках непрерывно синтезируются новые вещества, выполняется механическая работа, связанная с движением, происходит транспорт веществ и вырабатывается тепло. За миллиарды лет эволюции клетки научились использовать энергию более экономно и более эффективно, чем использует ее большинство машин, созданных человеком. Действительно, на живые клетки мы смотрим теперь, как на модели, с помощью которых нам следует создавать новые, более совершенные устройства для преобразования энергии, и в первую очередь для улавливания энергии Солнца.

Раздел биохимии, занимающийся вопросами преобразования и использования энергии в живых клетках, носит название биоэнергетики. Мы начнем эту главу с рассмотрения нескольких основных принципов термодинамики, т. е. той области физики, которая имеет дело с превращениями энергии. После этого мы обратимся к системе АТР, чтобы выяснить, как с ее помощью совершается в клетках перенос энергии от катаболических реакций, в которых энергия выделяется, к тем клеточным процессам, для которых она необходима.

14.1. Первый и второй законы термодинамики

Энергия известна нам в различных формах; мы знаем электрическую, механическую, химическую, тепловую и световую энергию. Мы знаем также, что энергия может переходить из одной формы в другую. Так, в электромоторе электрическая энергия преобразуется в механическую, в аккумуляторе происходит преобразование химической энергии в электрическую, а в паровой турбине в механическую энергию преобразуется тепло. Различные формы энергии связаны друг с другом определенными количественными соотношениями: например, 1 кал тепловой энергии теоретически соответствует $4{,}185 \cdot 10^7$ эрг механической энергии.

Известно, однако, что любой переход энергии из одной формы в другую сопровождается некоторыми потерями. Электрический мотор, преобразующий электрическую энергию в механическую, вырабатывает всегда меньше полезной энергии, чем потребляет, потому что из-за трения часть энергии переходит в тепло, которое рассеивается в окружающем пространстве, и уже не может быть использовано. Практически всякий раз, когда энергия используется для производства работы или когда она переходит из одной формы в другую, часть полезной энергии теряется. Во многих машинах на выполнение полезной работы расходуется менее 25% потребляемой энергии. Многочисленные количественные исследования по взаимопревращению различных форм энергии, выпол-

ненные физиками и химиками, позволили сформулировать два фундаментальных закона термодинамики. Мы попытаемся изложить здесь их суть в наиболее простой и доступной форме.

а. Первый закон

При любом физическом или химическом изменении общее количество энергии во Вселенной остается постоянным.

Первый закон – это закон сохранения энергии; его можно сформулировать и так: энергия не появляется и не исчезает. Всякий раз, когда энергия используется для выполнения работы или же переходит из одной формы в другую, общее количество энергии остается неизменным.

б. Второй закон

Все физические или химические процессы стремятся идти в направлении, соответствующем необратимому переходу полезной энергии в хаотическую, неупорядоченную форму. Мерой такого перехода служит величина, которая носит название энтропии. Процесс останавливается, когда наступает состояние равновесия, при котором энтропия имеет максимально возможное при данных условиях значение.

Эта упрощенная и в какой-то мере абстрактная формулировка требует некоторых пояснений. Прежде всего необходимо более точно определить понятия «полезная энергия» и «энтропия». Есть два вида полезной энергии: 1) *свободная энергия*, которая может производить работу при *постоянной температуре* и *постоянном давлении*, и 2) *тепловая энергия*, способная производить работу только *при изменении температуры и давления*. Энтропия является количественной характеристикой или мерой неупорядоченной (в известном смысле бесполезной) энергии в данной системе. Строгое определение понятия энтропии требует математического рассмотрения понятия «неупорядоченность». Поскольку мы не имеем здесь такой возможности, попробуем на нескольких простых примерах качественно охарактеризовать понятие энтропии (дополнение 14.1).

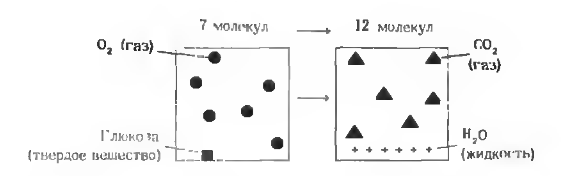
Дополнение 14-1. Понятие энтропии

Термин «энтропия», буквально означающий «внутреннее изменение» или «внутреннее превращение», впервые был введен в 1851 г. немецким физиком Рудольфом Клаузиусом, которому принадлежит одна из первых формулировок второго закона термодинамики. Строгая количественная интерпретация энтропии может быть дана на основе статистических и вероятностных представлений. Качественный смысл этого понятия можно проиллюстрировать на трех примерах, каждый из которых характеризует определенный аспект энтропии. Главное, чтó всегда связывают с энтропией,– это неупорядоченность системы, которая в разных случаях может проявляться по-разному.

Случай 1. Чайник и рассеяние тепла. Известно, что пар, образующийся при кипении воды, может совершать полезную работу. Представим себе, однако, что, как только температура воды в чайнике (т. е. в «системе») достигнет 100°С, мы выключим под ним огонь и дадим ему просто остыть в кухне (т. е. в «окружающей среде»). При этом не будет произведено никакой работы. Вместо этого из чайника в окружающую среду будет переходить тепло, постепенно повышая температуру среды (т. е. кухни) до тех пор, пока, наконец, не будет достигнуто полное тепловое равновесие. В этот момент все части нашего чайника и кухни будут иметь практически одну и ту же температуру. Свободная

энергия, которая была сконцентрирована в чайнике, когда он был заполнен водой, нагретой до 100°С, и которая потенциально могла производить работу, исчезла. Эквивалентное ей количество тепловой энергии после охлаждения чайника осталось в системе «чайник + кухня» (т. е. во «Вселенной»), но оно перераспределилось между разными частями системы беспорядочно, или, иначе говоря, равномерно. Эта энергия уже недоступна и не может производить работу, потому что в пределах кухни уже нет перепада температур. Более того, возрастание энтропии в кухне (в «окружающей среде»), обусловленное охлаждением чайника, необратимо. Действительно, из повседневного опыта нам хорошо известно, что тепло самопроизвольно никогда не перейдет обратно, т. е. от кухни к остывшему чайнику, и не нагреет в нем воду до 100°С.

Случай 2. Окисление глюкозы. Энтропия характеризует состояние не только энергии, но и вещества. Аэробные организмы извлекают свободную энергию из глюкозы, которую они получают из окружающей среды. Для того чтобы добыть эту энергию, они окисляют глюкозу молекулярным кислородом, также поступающим из среды. Конечные продукты окислительного метаболизма глюкозы, CO_2 и H_2O, возвращаются в окружающую среду. При этом процессе энтропия окружающей среды возрастает, а сам организм остается в стационарном состоянии и степень его внутренней упорядоченности не изменяется. Возрастание энтропии и в этом случае отчасти связано с рассеянием тепла, но здесь возникает неупорядоченность и другого рода, иллюстрируемая суммарным уравнением окисления глюкозы в живых организмах: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$. Схематически этот процесс можно изобразить следующим образом:



Атомы, входившие ранее в состав одной молекулы глюкозы и шести молекул кислорода, т. е. составлявшие в общей сложности семь молекул, распределились в результате реакции более равномерно, поскольку из семи молекул теперь образовалось двенадцать ($6CO_2$ + $6H_2O$).

Всякий раз, когда в результате химической реакции увеличивается число молекул или когда какое-нибудь твердое вещество, например глюкоза, превращается в жидкие или газообразные продукты, молекулы которых обладают бóльшим числом степеней свободы и легче могут перемещаться в пространстве по сравнению с твердым веществом, степень молекулярной неупорядоченности возрастает и энтропия, следовательно, увеличивается.

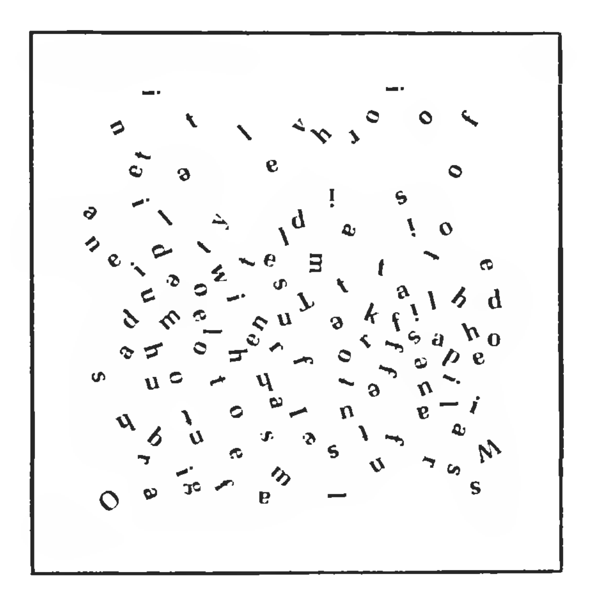
Случай 3. Информация и энтропия. В «Юлии Цезаре» Шекспира (акт IV, сцена 3) Брут, узнав о том, что на него движется со своей армией Марк Антоний, произносит следующие слова:

There is a tide in the affairs of men,
Which taken at the flood, leads on to fortune;

Omitted, all the voyage of their life
Is bound in shallows and in miseries[1].

Перед нами богатое информацией сообщение, записанное при помощи букв английского алфавита; всего их здесь 125. Помимо своего прямого смысла эти слова имеют еще и другой, скрытый смысл. В них отражается не только сложная последовательность событий в пьесе, но также и мысли автора о столкновении интересов, о честолюбии, о жажде власти. Чувствуется глубокое проникновение Шекспира в человеческую природу. Таким образом, объем заключенной в них информации очень велик.

Представим себе теперь, что 125 букв, составляющих эту цитату, рассыпаны в совершенном беспорядке, как показано здесь на рисунке



Весь смысл оказался утрачен. В такой форме эти 125 букв практически не несут никакой информации, но их энтропия весьма велика. Из этого следует вывод, что информация представляет собой одну из форм энергии; ее иногда называют «отрицательной энтропией». Действительно, *теория информации*, т. е. та область математики, на которой базируется программная логика компьютеров, весьма тесно связана с термодинамической теорией. Живые организмы – это высокоупорядоченные структуры, содержащие колоссальное количество информации и соответственно бедные энтропией.

1 В делах людей прилив есть и отлив,
С приливом достигаем мы успеха,
Когда ж отлив наступит, лодка жизни
По отмелям несчастий волочится.

(У. Шекспир. Полное собрание сочинений, «Искусство», т. 5, с. 303. Перевод М. Зенкевича.)

Есть и другой аспект второго закона, который следует учитывать для понимания того, как действует этот закон, особенно в биологических системах. Введем прежде всего понятие *реакционной системы*, под которой подразумевается совокупность веществ, обеспечивающих протекание данного химического или физического процесса.

Такой системой может быть, например, организм животного, отдельная клетка или два реагирующих друг с другом соединения. Далее мы должны ввести понятие *окружающей среды*, с которой реакционная система может обмениваться энергией. Совокупность реакционной системы и окружающей среды составляет то, что мы называем «*Вселенной*» (рис. 14-1) и что, вообще говоря, включает в себя земной шар и космическое пространство. Некоторые химические или физические процессы могут, конечно, протекать в *замкнутых системах*, не способных к обмену энергией с окружающей средой. Однако в реальном мире, и особенно в мире биологическом, системы, в которых протекают химические и физические процессы, обмениваются энергией с окружающей средой. Мы скоро убедимся, насколько важно это разграничение между системой и окружающей средой, когда речь идет об обмене энергией.

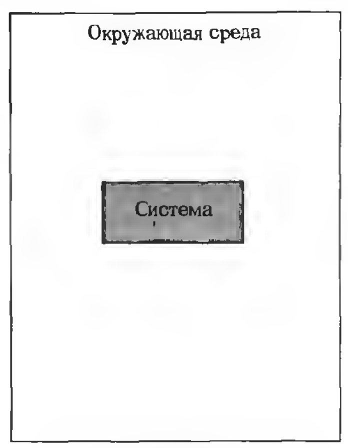


Рис. 14-1. Схематическое изображение реакционной системы и окружающей среды. В реакциях, протекающих при постоянной температуре и постоянном давлении, между системой и окружающей средой возможен обмен энергией, однако такой обмен должен происходить в соответствии с законами термодинамики. Первый из них гласит, что общее количество энергии во «Вселенной» (система + окружающая среда) остается постоянным. Согласно второму закону, при физическом или химическом изменении в системе энтропия Вселенной увеличивается; одновременно уменьшается свободная энергия реакционной системы. Наряду с этими изменениями от системы к окружающей среде или от окружающей среды к системе может передаваться тепло, как это следует из соотношения

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Изменения свободной энергии, теплоты и энтропии в химических реакциях, протекающих при постоянной температуре и постоянном давлении, т. е. в условиях, характерных именно для биологических систем, связаны друг с другом количественно следующим уравнением:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \qquad (1)$$

где ΔG – изменение свободной энергии *реакционной системы*, ΔH – изменение ее теплосодержания, или *энтальпии* (от греч. «enthálpō» – нагреваю), T – абсолютная температура, при которой протекает данный процесс, и ΔS – изменение энтропии «*Вселенной*», которая включает в себя и данную реакционную систему. По мере того как химическая реакция стремится к состоянию равновесия, энтропия Вселенной (система + окружающая среда) возрастает. Поэтому величина ΔS в реальном мире всегда имеет положительное значение. В принципе в некой идеальной системе реакция может протекать и без увеличения энтропии. *Увеличению* энтропии *Вселенной* при какой-либо реакции должно, согласно уравнению (1), соответствовать *уменьшение* свободной энергии реакционной *системы*. Поэтому величина ΔG *реакционной системы* имеет всегда отрицательное значение. Изменение энтальпии ΔH определяется как количество тепла, которое данная реакционная система отдает окружающей среде или получает от нее при постоянной температуре и постоянном давлении. Если реакционная система теряет (т. е. отдает) тепло, то величина ΔH имеет отри-

цательное значение; если же система получает тепло от окружающей среды, то ΔH выражается положительной величиной.

Для биологических систем существенна еще одна важная особенность изменений энтропии. Согласно второму закону термодинамики, при химических реакциях или физических процессах энтропия *Вселенной* увеличивается. Из этого закона, однако, не следует, что возрастание энтропии должно происходить обязательно в самой реакционной системе; оно может произойти в любом другом участке Вселенной. В живых организмах метаболические процессы, т. е. те превращения, которым подвергаются в них пищевые вещества, не ведут к возрастанию внутренней неупорядоченности, или энтропии самих организмов. Из повседневных наблюдений мы знаем, что любой организм, будь то муха или слон (т. е. в нашем понимании «система»), при всех процессах жизнедеятельности сохраняет присущую ему сложную и упорядоченную структуру. В результате процессов жизнедеятельности возрастает энтропия не самих живых организмов, а *окружающей среды. Живые организмы сохраняют внутреннюю упорядоченность, получая свободную энергию в виде пищевых веществ (или солнечного света) из окружающей среды и возвращая в нее такое же количество энергии в менее полезной форме, главным образом в форме тепла, которое рассеивается во всей остальной Вселенной.*

В заключение следует подчеркнуть, что сам по себе рост энтропии, или увеличение степени неупорядоченности, нельзя считать совершенно бесполезным. Поскольку увеличение энтропии Вселенной при биологических процессах необратимо, оно создает *движущую силу* и задает *направление* всем видам биологической активности. Живые организмы непрерывно повышают энтропию в окружающей среде, и этим Вселенная расплачивается за поддержание в них внутреннего порядка.

Здесь, по-видимому, целесообразно рассмотреть какую-нибудь конкретную химическую реакцию из числа протекающих в клетке, для того чтобы получить представление о возможных величинах изменений разных форм энергии. В аэробных клетках происходит окисление глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) до CO_2 и H_2O при постоянной температуре и постоянном давлении

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O.$$

Если принять, что эта реакция протекает в стандартных условиях, а для термодинамических расчетов это значит, что температура равна 25°С, или 298 К, и давление равно 1 атм (760 мм рт. ст.), то на 1 моль окисленной глюкозы

$\Delta G = -686\,000$ кал/моль (свободная энергия системы, т. е. реагирующих молекул, уменьшилась)

$\Delta H = -673\,000$ кал/моль (реагирующие молекулы отдали тепло)

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} =$$

$$= \frac{-673\,000 - (-686\,000)}{298} =$$

$= +44$ кал/моль·град (энтропия Вселенной увеличилась)

Увеличение степени молекулярной неупорядоченности, или энтропии, которым сопровождается окисление глюкозы, можно представить себе достаточно наглядно с помощью примера, приведенного в дополнении 14.1.

14.2. Клеткам необходима свободная энергия

Тепло не является для клеток сколько-нибудь существенным источником энергии, так как тепло способно производить работу лишь в том случае, если оно переходит от более нагретого тела к более холодному или из зоны с более высокой температурой в зону с более низкой температурой. Кроме того, к. п. д. теплового двигателя зависит, как известно, от разности температур между нагретым и холодным телом; чем эта разность больше,

тем бо́льшая доля тепловой энергии может быть превращена в работу. Поскольку в живых клетках температура в любой точке практически одинакова, они не способны использовать тепловую энергию. Тепло служит им лишь для поддержания оптимальной рабочей температуры.

Пригодная для клеток форма энергии, т.е. та форма, которую они и могут, и должны использовать,—это *свободная энергия*, способная производить работу при постоянной температуре и постоянном давлении. Гетеротрофные клетки извлекают необходимую им энергию из богатых энергией пищевых веществ, а для фотосинтезирующих клеток ее источником служит улавливаемая ими энергия солнечного света. Полученная свободная энергия переводится теми и другими клетками в одну и ту же форму—в химическую энергию, которая затем используется для выполнения работы в процессах, не связанных со сколько-нибудь заметным перепадом температур. Попросту говоря, *клетки—это химические двигатели*, работающие в условиях постоянства температуры и давления.

Теперь мы познакомимся с тем, как измеряют и в какой форме выражают свободную энергию химических реакций.

14.3. Изменение стандартной свободной энергии химической реакции можно вычислить

Любая химическая реакция характеризуется определенным *изменением стандартной свободной энергии* ΔG^0. [Ниже будет показано, что величина ΔG^0 отличается от величины ΔG, которую получают из уравнения (1).] Для данной химической реакции изменение стандартной свободной энергии есть величина постоянная; ее можно вычислить из константы равновесия этой реакции для *стандартных условий*, т.е. температуры 25°С (298 К) и давления 1 атм (760 мм рт. ст.). Константа равновесия K'_{eq} реакции А + В ⇄ С + D равна (разд. 4.5)

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]},$$

где [A], [B], [C] и [D]—молярные концентрации реагирующих веществ в состоянии равновесия при стандартных условиях. Уравнение реакции, в которой участвует больше одной молекулы исходных веществ и конечных продуктов, имеет вид

$$aA + bB \rightleftarrows cC + dD,$$

где a, b, c и d—число молекул реагирующих веществ А, В, С и D. В этом случае константа равновесия равна

$$K'_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}.$$

Теперь, когда мы определили константу равновесия химической реакции, мы можем вычислить изменение стандартной свободной энергии для этой реакции, которое принято выражать в *калориях* на моль реагирующего вещества. Калория—это единица, чаще всего применяемая в биологии для измерения энергии. Численно она равна количеству энергии в форме теплоты, которое необходимо для нагревания 1,00 г воды от 15 до 16°С. Изменение стандартной свободной энергии ΔG^0 вычисляют из уравнения

$$\Delta G^0 = -2{,}303\, RT \lg K'_{eq},$$

где R—газовая постоянная [1,987 кал/ /(моль·К)] и T—абсолютная температура, в данном случае 298 К. Для химической реакции, у которой константа равновесия равна 1,0, изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^0 = 0$, потому что логарифм 1,0 равен нулю. Если константа равновесия данной реакции больше 1,0, то величина ΔG^0 отрицательна; если же она меньше 1,0, то величина ΔG^0 положительна.

Полезно также определить изменение стандартной свободной энергии и другим путем. ΔG^0—это разность между свободной энергией исходных веществ и свободной энергией продуктов реакции при стандартных условиях, т.е. при температуре 298 К, давлении 1 атм и исходных концентрациях всех компонентов реакции 1,0 М. Отрицательное значение ΔG^0 означает, что в продуктах реакции содержится меньше свободной энергии, чем

в исходных веществах, а потому при стандартных условиях равновесие будет смещено вправо, т. е. в сторону образования продуктов, поскольку все реакции стремятся идти в направлении, соответствующем уменьшению свободной энергии системы. Положительное значение ΔG^0 означает, что продукты реакции содержат больше свободной энергии, чем исходные вещества. Поэтому реакция при исходных концентрациях компонентов 1,0 М будет идти в обратном направлении, справа налево. Сформулируем это более четко. При исходных концентрациях всех компонентов 1,0 М реакции, для которых величина ΔG^0 отрицательна, идут в направлении слева направо до тех пор, пока не установится равновесие. Реакции же, для которых в этих же условиях величина ΔG^0 положительна, идут в обратном направлении, т. е. справа налево, до установления равновесия. В табл. 14.1 показана зависимость направления реакции от знака ΔG^0. *В сущности, изменение стандартной свободной энергии любой химической реакции — это просто один из возможных способов математического выражения ее константы равновесия*. В табл. 14.2 показаны соотношения между численными значениями ΔG^0 и K'_{eq}.

Таблица 14-1. Соотношение между величинами K'_{eq} и $\Delta G^{0'}$ и направление химических реакций при стандартных условиях

K'_{eq}	$\Delta G^{0'}$	Направление реакции при исходных концентрациях компонентов 1,0 М
> 1,0	Отрицательное	Слева направо
1,0	Равно нулю	Состояние равновесия
< 1,0	Положительное	Справа налево

Отметим два существенных обстоятельства. Поскольку биохимические реакции протекают обычно при значениях pH, близких к 7,0, и нередко сопровождаются образованием или потреблением ионов H^+, *в биохимической энергетике в качестве стандартного принято состояние при pH 7,0*. Изменение стандартной свободной энергии биохимических систем при pH 7,0 обозначается символом $\Delta G^{0'}$, которым мы и будем пользоваться в дальнейшем.

Таблица 14-2. Соотношение между константами равновесия и величинами изменения стандартной свободной энергии химических реакций

K'_{eq}	$\Delta G^{0'}$, кал/моль
0,001	+ 4089
0,01	+ 2726
0,1	+ 1363
1,0	0
10,0	− 1363
100,0	− 2726
1000,0	− 4089

Второе замечание касается единиц энергии. В Международной системе единиц (СИ) за единицу энергии принят *джоуль* (Дж). Название это дано в честь английского физика Джеймса Джоуля (1818–1889), который впервые получил экспериментальное подтверждение первого закона термодинамики — закона сохранения энергии. Однако в медицине и биологии энергию принято выражать в калориях, и этими единицами мы будем пользоваться в нашей книге. Калории легко перевести в джоули: 1,00 кал = = 4,184 Дж.

14.4. Химические реакции характеризуются определенной величиной $\Delta G^{0'}$

Вычислим теперь величину изменения стандартной свободной энергии для реакции, катализируемой ферментом *фосфоглюкомутазой* (о роли этого фермента в клетке мы будем говорить в следующей главе):

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} \xrightleftharpoons{\text{Фосфоглюкомутаза}} \text{Глюкозо-6-фосфат.}$$

Химический анализ показывает, что если исходная концентрация глюкозо-1-фосфата равна, допустим, 0,02 М, то при избытке фермента реакция протекает в прямом направлении (слева направо), а если исходная концентрация глюкозо-6-фосфата равна 0,02 М, то реакция протекает в обратном направлении (справа налево), причем конечный результат оказывается одинаковым: в равновесной смеси при 25°С и рН 7,0 концентрации глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата составляют соответственно 0,001 и 0,019 М. (Вспомним, что фермент не смещает равновесие данной реакции, а только ускоряет его достижение.) Рассчитаем из этих данных константу равновесия фосфоглюкомутазной реакции

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Глюкозо-6-фосфат}]}{[\text{Глюкозо-1-фосфат}]} = \frac{0{,}019}{0{,}001} = 19{,}0.$$

Зная величину K'_{eq}, мы можем определить изменение стандартной свободной энергии:

$$\Delta G^{0'} = -2{,}303\,RT\lg K'_{eq} =$$

$$= -2{,}303 \cdot 1{,}987 \cdot 298 \lg 19{,}0 =$$

$$= -1360 \cdot 1{,}28 = -1740 \text{ кал/моль}.$$

Изменение стандартной свободной энергии выражается в этом случае отрицательной величиной, и, следовательно, превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат при исходных концентрациях глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата 1,0 М протекает с потерей свободной энергии. Для биохимических реакций величины $\Delta G^{0'}$ принято выражать в килокалориях; в нашем примере $\Delta G^{0'} = -1{,}74$ ккал/моль.

В табл. 14.3 приведены величины изменения стандартной свободной энергии для ряда характерных химических реакций. Из этой таблицы видно, что гидролиз таких соединений, как некоторые сложные эфиры, амиды, пептиды и гликозиды, а также реакции перегруппировки и элиминирования, сопровождаются сравнительно небольшим изменением стандартной свободной энергии, тогда как гидролиз ангидридов кислот характеризуется относительно большой величиной $\Delta G^{0'}$. Особенно же большим уменьшением стандартной свободной энергии сопровождается окисление органических соединений до CO_2 и H_2O. Позже, однако, мы увидим (гл. 15 и 17), что данные об изменениях стандартной свободной энергии, подобные тем, которые приведены в табл. 14.3, ничего в сущности не говорят нам о том, какая часть свободной энергии может реально использоваться в биологических системах.

Таблица 14-3. Изменения стандартной свободной энергии для некоторых химических реакций при рН 7,0; 25°С

Реакция	$\Delta G^{0'}$, ккал/моль
Гидролиз:	
Ангидриды кислот:	
Уксусный ангидрид + H_2O → 2Ацетат	−21,8
АТР + H_2O → ADP + Фосфат	−7,3
Сложные эфиры:	
Этилацетат + H_2O → Этанол + Ацетат	−4,7
Глюкозо-6-фосфат + H_2O → Глюкоза + Фосфат	−3,3
Амиды и пептиды:	
Глутамин + H_2O → Глутамат + NH_4^+	−3,4
Глицилглицин + H_2O → 2Глицин	−2,2
Гликозиды:	
Мальтоза + H_2O → 2Глюкоза	−3,7
Лактоза + H_2O → Глюкоза + Галктоза	−3.8
Перегруппировка:	
Глюкозо-1-фосфат → Глюкозо-6-фосфат	−1,74
Фруктозо-6-фосфат → Глюкозо-6-фосфат	−0,40
Отщепление воды:	
Малат → Фумарат + H_2O	+0,75
Окисление молекулярным кислородом:	
Глюкоза + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	−686
Пальмитиновая кислота + $23O_2$ → $16CO_2$ + $16H_2O$	−2338

14.5. Величины $\Delta G^{0\prime}$ и ΔG различаются, и это различие имеет важное значение

Следует ясно отдавать себе отчет в том, что изменение свободной энергии ΔG и *изменение стандартной свободной энергии* $\Delta G^{0\prime}$ – это две разные величины. Как мы уже знаем, при любом спонтанном химическом или физическом процессе свободная энергия реакционной системы всегда уменьшается, т. е. ΔG выражается всегда отрицательной величиной. Но мы знаем также, что любой химической реакции соответствует строго определенное изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$, которое может быть положительным, отрицательным или равным нулю в зависимости от константы равновесия данной реакции. По величине изменения стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ мы судим о том, в каком направлении и как далеко пойдет реакция до того момента, когда в системе установится равновесие, если эта реакция протекает в стандартных условиях, т. е. *при исходных концентрациях всех компонентов 1,0 М, pH 7,0 и температуре 25 С*. Величина $\Delta G^{0\prime}$, следовательно, есть строго определенная константа, характерная для каждой данной реакции. Истинное же изменение свободной энергии ΔG для данной химической реакции зависит от условий, при которых эта реакция фактически протекает (т. е. от концентрации реагирующих компонентов, pH и температуры), а эти условия могут и не совпадать со стандартными. Кроме того, величина ΔG любой реакции, стремящейся к равновесию, всегда отрицательна и уменьшается по абсолютной величине (становится менее отрицательной) с приближением к равновесию; в момент достижения равновесия она равна нулю, и это свидетельствует о том, что за счет данной реакции больше уже не может быть произведено никакой работы.

Значения ΔG и $\Delta G^{0\prime}$ для реакции $A + B \rightarrow C + D$ связаны уравнением

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + 2{,}303RT\lg\frac{[C][D]}{[A][B]},$$

в котором величины, выделенные красным, характеризуют истинное состояние данной системы.

Рассмотрим простой пример. Примем, что реакция $A + B \rightarrow C + D$ протекает при стандартной температуре (25°С) и стандартном давлении (1 атм), но что исходные концентрации компонентов А, В, С и D не равны между собой и ни для одного из компонентов не равны стандартному значению 1,0 М. Чтобы определить истинное изменение свободной энергии ΔG для случая, когда равновесие устанавливается при этих нестандартных исходных концентрациях, достаточно просто подставить в приведенное выше уравнение истинные исходные концентрации компонентов А, В, С и D; величины R, T и $\Delta G^{0\prime}$ сохранят при этом, разумеется, свое обычное значение. Решение этого уравнения дает величину ΔG, т. е. изменение свободной энергии данной реакции для тех концентраций компонентов, при которых эта реакция фактически протекает. Величина ΔG будет отрицательной и будет уменьшаться во времени, поскольку концентрации А и В по мере протекания реакции будут снижаться, а концентрации С и D возрастать. Итак, величина ΔG реально протекающей химической реакции всегда имеет отрицательное значение и всегда стремится к нулю, тогда как $\Delta G^{0\prime}$ есть величина постоянная.

Важно помнить, что величины $\Delta G^{0\prime}$ и ΔG указывают лишь максимальное количество свободной энергии, которое теоретически способна дать рассматриваемая реакция. Это количество энергии может быть использовано только в том случае, если в наличии имеется какой-нибудь высокоэффективный механизм, способный уловить эту энергию и направить ее на выполнение полезной работы. Если же такого механизма нет, то при постоянной температуре и постоянном давлении никакая работа за счет данной реакции не может быть выполнена.

14.6. Изменения стандартной свободной энергии химических реакций аддитивны

Рассмотрим две последовательно протекающие химические реакции:

$$A \rightarrow B \qquad \Delta G_1^{0\prime},$$
$$B \rightarrow C \qquad \Delta G_2^{0\prime}.$$

Каждая из этих реакций характеризуется определенной константой равновесия и определенным изменением стандартной свободной энергии, $\Delta G_1^{0\prime}$ и $\Delta G_2^{0\prime}$. Поскольку эти две химические реакции протекают последовательно одна за другой, мы можем исключить компонент В и записать суммарную реакцию в виде

$$A \rightarrow C.$$

Суммарная реакция также имеет свою константу равновесия, и, следовательно, для нее можно рассчитать изменение стандартной свободной энергии $\Delta G_S^{0\prime}$. Это подводит нас к очень важному свойству изменений стандартной свободной энергий. Оказывается, *величины $\Delta G^{0\prime}$ последовательно протекающих химических реакций аддитивны.* Изменение стандартной свободной энергии суммарной реакции А → С, которое мы обозначили через $\Delta G_S^{0\prime}$, равно алгебраической сумме изменений стандартной свободной энергии двух ее отдельных стадий, т.е. величин $\Delta G_1^{0\prime}$ и $\Delta G_2^{0\prime}$.

$$\Delta G_S^{0\prime} = \Delta G_1^{0\prime} + \Delta G_2^{0\prime}.$$

Это соотношение крайне важно, поскольку оно дает возможность легко вычислять изменения стандартной свободной энергии для различных последовательностей метаболических реакций. Например, при расщеплении гликогена в мышцах (о котором будет идти речь в следующей главе) протекают две последовательные реакции:

Глюкозо-1-фосфат
↓ Фосфоглюкомутаза $\Delta G^{0\prime} = -1{,}74$ ккал/моль
Глюкозо-6-фосфат
↓ Глюкозофосфат-изомераза $\Delta G^{0\prime} = +0{,}40$ ккал/моль
Фруктозо-6-фосфат

Уравнение суммарной реакции имеет вид

Глюкозо-1-фосфат → Фруктозо-6-фосфат.

Изменение стандартной свободной энергии этой реакции можно определить как алгебраическую сумму величин $\Delta G^{0\prime}$ последовательных стадий:

$$\Delta G_S^{0\prime} = -1{,}74 + (+0{,}40) = -1{,}34 \text{ ккал/моль}.$$

Часто оказывается возможным вычислить изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ для какой-либо реакции даже в том случае, когда константа истинного равновесия этой реакции нам не известна. Это можно сделать, если удастся связать исследуемую реакцию с какой-нибудь другой реакцией (для которой известна величина $\Delta G^{0\prime}$) и определить константу равновесия суммарной реакции.

14.7. АТР – главный химический посредник клетки, связывающий между собой процессы идущие с выделением и с потреблением энергии

Теперь, познакомившись с некоторыми основными законами, которые регулируют обмен энергии в химических системах, мы можем обратиться к рассмотрению энергетического цикла в клетках. Для гетеротрофных клеток источником свободной энергии, получаемой в химической форме, служит процесс расщепления, или катаболизм, пищевых молекул (в основном углеводов и жиров). Эту энергию клетки используют в следующих целях: 1) для синтеза биомолекул из молекул-предшественников небольшого размера; 2) для выполнения механической работы, например мышечного сокращения, 3) для переноса веществ через мембраны против градиента концентрации и 4) для обеспечения точной передачи информации. Главным связующим звеном между клеточными реакциями, идущими с выделением и с потреблением энергии, служит аденозинтрифосфат (АТР; рис. 14-2). При расщеплении высокоэнергетического клеточного топлива часть содержащейся в этом топливе сво-

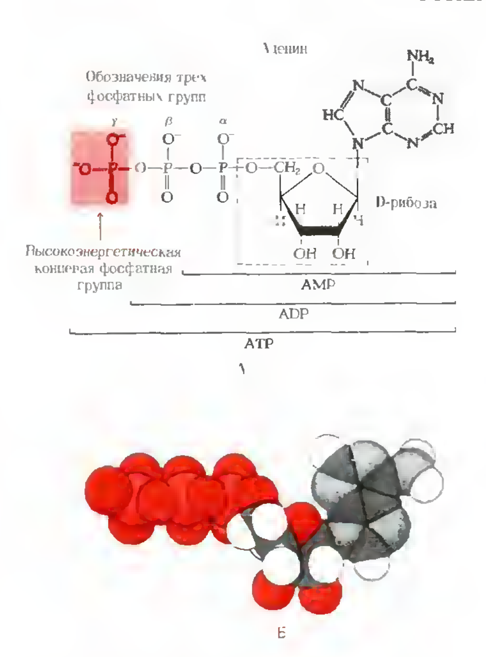


Рис. 14-2. *А*. Структуры ATP, ADP и AMP. Фосфатные группы ATP обозначают греческими буквами α (альфа), β (бета) и γ (гамма). Концевая фосфатная группа ATP может переноситься с помощью ферментов на различные акцепторы фосфата. При pH 7 фосфатные группы полностью ионизованы. *Б*. Пространственная модель молекулы ATP.

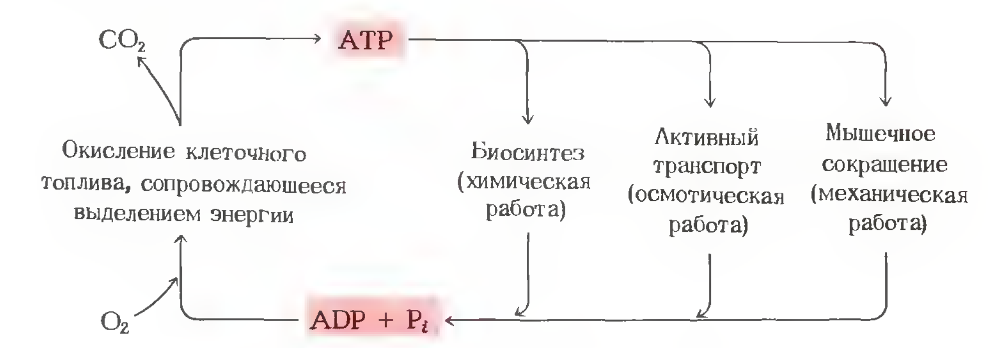
бодной энергии улавливается, в том смысле что она используется для синтеза ATP из аденозиндифосфата (ADP) и неорганического фосфата (P_i) – процесса, требующего затраты свободной энергии. Позже ATP, распадаясь на ADP и фосфат (рис. 14-3), отдает значительное количество своей химической энергии тем процессам, для которых энергия необходима. Таким образом, ATP выступает в роли переносчика химической энергии, связывающего клеточные процессы, сопровождающиеся выделением энергии, с теми главными видами клеточной активности, в которых энергия потребляется. ATP поставляет энергию и для таких процессов жизнедеятельности, как люминесценция, которая у светляков служит сигналом для привлечения особей противоположного пола.

Впервые ATP был обнаружен в экстрактах скелетных мышц Карлом Ломаном в Германии, и почти одновременно в 1929 г. два американских исследователя – Сайрус Фиске и Йеллапрагада Суббароу – выделили это соединение. Сначала думали, что ATP играет важную роль только в процессах мышечного сокращения; однако затем выяснилось, что он присутствует в клетках всех типов – животных, растительных и бактериальных. Обнаружилось также, что ATP принимает участие в клеточных процессах самого разного типа. В 1941 г. Фриц Липман, убедившись в универсальном значении всех этих наблюдений, выдвинул обобщающую концепцию, согласно которой ATP в клетках играет роль главного и универсального переносчика химической энергии. Он первым высказал предположение о существовании в клетках ATP-цикла (рис. 14.3).

14.8. Химические свойства ATP хорошо известны

Аденозинтрифосфат (ATP) и продукты последовательных стадий его гидролиза,

Рис. 14-3. ATP-цикл в клетках.



аденозиндифосфат (ADP) и *аденозинмонофосфат* (AMP), принадлежат к классу *нуклеотидов* (рис. 14-2). Напомним (гл. 3), что молекулы нуклеотидов состоят из гетероциклического основания (пурина или пиримидина), пятиуглеродного сахара и одной или нескольких фосфатных групп. В молекулах ATP, ADP и AMP роль основания играет *аденин* (пурин), а пятиуглеродный сахар представлен *D-рибозой* (рис. 14-2). Различные виды нуклеотидов, которых известно довольно много, отличаются друг от друга природой входящих в их состав азотистых оснований и сахаров. Нуклеотиды выполняют в клетке самые разнообразные функции, но более всего они известны как строительные блоки молекул ДНК и РНК, в которых они служат кодирующими элементами. ATP, ADP и AMP (рис. 14-2) обнаружены у всех живых форм, и везде они выполняют одни и те же универсальные функции. Эти соединения присутствуют не только в цитозоле, но и в митохондриях, и в клеточном ядре. В нормально дышащих клетках на долю ATP приходится до 80% и даже более общего количества всех трех адениновых нуклеотидов (табл. 14-4).

При pH 7,0 ATP и ADP существуют в виде анионов, несущих несколько зарядов, ATP^{4-} и ADP^{3-}, поскольку все их фосфатные группы при этом значении pH почти полностью ионизованы. Однако во внутриклеточной жидкости, для которой характерно высокое содержание ионов Mg^{2+}, ATP и ADP, присутствуют главным образом в виде комплексов с магнием, $MgATP^{2-}$ и $MgADP^{-}$ (рис. 14-4). Во многих ферментативных реакциях, в которых ATP участвует в качестве донора фосфатной группы, активной формой ATP является именно его комплекс с магнием, $MgATP^{2-}$. Концентрация ATP в клетках поддерживается на относительно постоянном уровне, поскольку скорость его образования приблизительно уравновешивается скоростью его распада. Таким образом, концевые фосфатные группы молекул ATP претерпевают непрерывное обновление в процессе метаболизма. Они постоянно отщепляются и замещаются новыми за счет клеточного пула неорганического фосфата.

Таблица 14-4. Концентрация адениновых нуклеотидов, неорганического фосфата и креатинфосфата (КФ) в некоторых клетках, мМ [1]

	ATP	ADP	AMP	P_i	КФ
Печень крысы	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Мышцы крысы	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Эритроциты человека	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Мозг крысы	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
E. coli	7,90	1,04	0,82	7,9	0

[1] Для эритроцитов указаны концентрации в цитозоле, поскольку в эритроцитах нет ни ядра, ни митохондрий. Во всех других случаях имеется в виду общее содержание в клетке, хотя мы знаем, что, например, концентрации ADP в цитозоле и в митохондриях различаются очень сильно. О креатинфосфате (фосфокреатине) мы будем говорить позже в этой же главе.

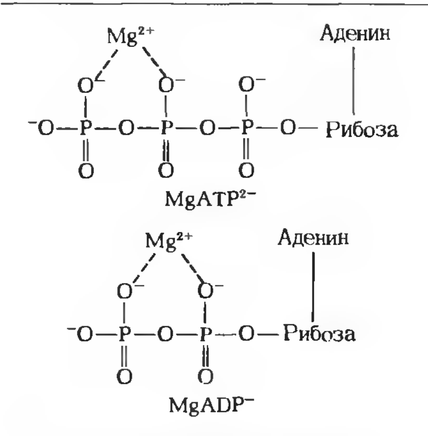


Рис. 14-4. Комплексы ATP и ADP с ионами Mg^{2+}.

ATP удалось синтезировать в лаборатории. Его структура и свойства были подробно изучены. Мы знаем также, что он служит связующим звеном между реакциями, идущими с выделением и с потреблением энергии. Эта его роль основана на известных химических принци-

пах, к рассмотрению которых мы теперь и перейдем.

14.9. Характерное значение, стандартной свободной энергии ATP

При гидролизе ATP, в результате которого ATP теряет концевую фосфатную группу, превращаясь в ADP и неорганический фосфат

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i,$$

изменение стандартной свободной энергии (табл. 14-3) составляет −7,3 ккал/моль.

Определены также изменения стандартной свободной энергии для гидролиза ряда других фосфорилированных соединений (табл. 14-5). Гидролиз некоторых из этих соединений в стандартных условиях приводит к освобождению несколько большего количества свободной энергии, чем гидролиз ATP, а других — меньшего. Например, величина $\Delta G^{0\prime}$ для ферментативной реакции

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \xrightarrow{\text{Глюкозо-6-фосфатаза}} \text{Глюкоза} + \text{Фосфат}$$

равна −3,3 ккал/моль, т. е. эта реакция приводит к освобождению значительно меньшего количества свободной энергии, чем гидролиз ATP ($\Delta G^{0\prime}$ = −7,3 ккал/моль). Поскольку в ранних исследованиях было установлено, что при гидролизе ATP высвобождается гораздо большее количество свободной энергии, чем при гидролизе глюкозо-6-фосфата и ряда других эфиров фосфорной кислоты, ATP стали называть *высокоэнергетическим фосфорилированным соединением*, а глюкозо-6-фосфат — *низкоэнергетическим*. Позже выяснилось, что в клетках присутствуют также и некоторые другие фосфорилированные соединения, в частности *фосфоенолпируват* и *3-фосфоглицероилфосфат* (табл. 14-5), гидролиз которых характеризуется гораздо более высокой стандартной свободной энергией, чем гидролиз ATP. Их тоже называют высокоэнергетическими фосфорилированными соединениями. Однако эти названия — «высокоэнергетические» и «низкоэнергетические» — заслоняют от нас тот факт, что мы имеем дело в сущности с тремя классами фосфорилированных соединений. Такие соединения, как фосфоенолпируват и 3-фосфоглицероилфосфат, со значительно большей стандартной свободной энергией гидролиза, чем у ATP, можно было бы назвать сверхвысокоэнергетическими соединениями. Мы скоро убедимся в том, что промежуточное значение $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза ATP очень важно для его биологической функции.

Из табл. 14-5 видно, что значения $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза ADP до AMP и фосфата и для реакции отщепления концевой фосфатной группы ATP одинаковы (−7,3 ккал/моль). Таким образом, обе концевые фосфатные группы ATP (β- и γ-) являются высокоэнергетическими. (В то же время величина $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза AMP до аденозина и фосфата намного ниже; она составляет всего −3,4 ккал/моль, т. е. AMP принадлежит к низкоэнергетическим соединениям.) Позже мы увидим (разд. 14.17), что при участии особого фермента эти фосфатные группы могут использоваться в клетке в реакциях, сопровождающихся потреблением энергии.

Таблица 14-5. Стандартная свободная энергия гидролиза некоторых фосфорилированных соединений

	ΔG^0, ккал/моль
Фосфоенолпируват	−14,8
3-фосфоглицероилфосфат (→ 3-фосфоглицерат + P_i)	−11,8
Креатинфосфат	−10,3
ADP (→ AMP + P_i)	−7,3
ATP (→ ADP + P_i)	−7,3
AMP (→ Аденозин + P_i)	−3,4
Глюкозо-1-фосфат	−5,0
Фруктозо-6-фосфат	−3,8
Глюкозо-6-фосфат	−3,3
Глицерол-1-фосфат	−2,2

14.10. Почему стандартная свободная энергия гидролиза АТР относительно велика?

Какими структурными особенностями молекулы АТР следует объяснить тот факт, что при гидролитическом отщеплении его концевой фосфатной группы выделяется гораздо больше свободной энергии, чем, например, при гидролизе глюкозо-6-фосфата? Для того чтобы ответить на этот вопрос, требуется учесть свойства не только субстрата, но и продуктов реакции, потому что изменение стандартной свободной энергии есть разность между свободной энергией исходных веществ и свободной энергией продуктов реакции. Величина стандартной свободной энергии гидролиза АТР определяется тремя главными структурными факторами. Первый из них – это степень диссоциации самого АТР и продуктов его гидролиза. При pH 7,0 АТР почти полностью ионизован, т.е. существует в виде аниона ATP^{4-}. В результате гидролиза АТР образуются не один, а три продукта: ADP^{3-}, HPO_4^{2-} и H^+. Суммарное уравнение гидролиза АТР имеет следующий вид:

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+.$$

В качестве стандартного состояния принято такое состояние системы, при котором концентрации ATP^{4-}, ADP^{3-} и HPO_4^{2-} равны 1,0 М. Однако концентрация водородных ионов при pH 7,0 (стандартное значение pH для расчетов $\Delta G^{0\prime}$) составляет всего лишь 10^{-7} М. Таким образом, концентрация водородных ионов очень мала по сравнению со стандартными концентрациями всех других компонентов (1,0 М), и, следовательно, по закону действующих масс, при pH 7,0 равновесие реакции гидролиза АТР должно быть очень сильно сдвинуто вправо. В отличие от этого гидролиз глюкозо-6-фосфата при pH 7,0 не ведет к образованию сколько-нибудь заметных количеств ионов H^+:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + HPO_4^{2-}.$$

Вторая причина, обусловливающая относительно большую величину $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза АТР, заключается в том, что при pH 7,0 молекулы АТР несут четыре отрицательных заряда, располагающихся довольно близко друг от друга, вследствие чего между ними существует сильное отталкивание (рис. 14-2). Когда при гидролизе концевая фосфатная связь разрывается, электростатическое напряжение внутри молекул АТР снимается за счет пространственного разъединения отрицательно заряженных продуктов гидролиза ADP^{3-} и HPO_4^{2-}. Эти продукты несут заряды одного знака и не стремятся поэтому воссоединиться друг с другом и вновь образовать молекулу АТР. Иначе обстоит дело, когда гидролизу подвергается глюкозо-6-фосфат. Один из продуктов его гидролиза, глюкоза, вообще не несет заряда. Между глюкозой и другим продуктом гидролиза, ионом HPO_4^{2-}, не возникает поэтому сил отталкивания, и их стремление к рекомбинации оказывается в этом случае более сильным.

Наконец, третья важная причина большой отрицательной величины $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза АТР связана с тем обстоятельством, что два продукта реакции, а именно ADP^{3-} и HPO_4^{2-} представляют собой *резонансные гибриды*, т.е. такие структурные формы, для которых характерна повышенная устойчивость, поскольку часть их электронов находится в конфигурациях, обладающих значительно меньшей энергией, по сравнению с той, которой они обладали в конфигурациях, характерных для молекул АТР. Поэтому, когда АТР подвергается гидролизу, электроны в продуктах реакции ADP^{3-} и HPO_4^{2-} могут переходить на более низкие энергетические уровни, чем в негидролизованной молекуле АТР. Вследствие этого отделение друг от друга анионов ADP^{3-} и HPO_4^{2-} приводит к уменьшению запаса свободной энергии по сравнению с тем, которым они обладали, когда были объединены в виде аниона ATP^{4-}.

Про высокоэнергетические фосфорилированные соединения, т.е. про соединения, гидролиз которых сопровождается

значительным уменьшением стандартной свободной энергии, часто говорят, что они содержат «высокоэнергетическую фосфатную связь» (в структурных формулах ее обозначают символом ~). Хотя это выражение давно используется биохимиками, его нельзя признать удачным. Оно может быть неверно истолковано в том смысле, что энергия заключена в самой связи. В действительности это не так. Известно, что сам по себе разрыв химической связи требует затраты энергии. Свободная энергия, высвобождающаяся при гидролизе эфиров фосфорной кислоты, обязана своим происхождением не разрыву специфической фосфатной связи, а тому, что *продукты гидролиза содержат меньше свободной энергии, чем исходные вещества.* Что же касается названия «высокоэнергетические фосфорилированные соединения», то применительно к АТР и другим фосфорилированным соединениям, характеризующимся высоким значением $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза, оно вполне уместно.

Нам остается отметить еще одно очень важное обстоятельство, имеющее отношение к изменениям свободной энергии при биохимических реакциях. Хотя при стандартных условиях величина $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза АТР равна $-7,3$ ккал/моль, истинное изменение свободной энергии гидролиза АТР в интактных клетках существенно отличается от этой величины. Объясняется это тем, что концентрации АТР, ADP и P_i в живых клетках, во-первых, неодинаковы и, во-вторых, намного ниже стандартных концентраций 1,0 М. Расчетным путем можно определить истинное изменение свободной энергии гидролиза АТР при концентрациях, отличающихся от стандартных. В дополнении 14-2 в качестве примера приведен расчет величины ΔG гидролиза АТР в интактных эритроцитах, исходя из данных табл. 14-4. Оказывается, эта величина, обозначаемая через ΔG_p, значительно превышает $\Delta G^{0\prime}$; для большинства клеток она колеблется в пределах от -12 до -16 ккал/моль. Величину ΔG_p часто называют *потенциалом фосфорилирования*; мы еще будем говорить о ней позже.

14.11. АТР служит общим промежуточным продуктом в реакциях переноса фосфатных групп

Мы видели выше, что в термодинамической шкале фосфорилированных соединений АТР занимает промежуточное положение, т.е. характеризуется средней величиной $\Delta G^{0\prime}$. Именно эта особенность АТР наряду с другими его свойствами позволяет ему служить промежуточным переносчиком фосфатных групп от сверхвысокоэнергетических соединений, т.е. от таких, которые при гидролизе выделяют больше свободной энергии, чем АТР, к акцепторам фосфата, фосфорилированные производные которых характеризуются низким значением $\Delta G^{0\prime}$ и потому при гидролизе в стандартных условиях выделяют меньше свободной энергии, чем АТР.

Как же именно осуществляет АТР эту свою роль посредника? Мы уже знаем, что метаболические превращения включают цепь последовательных ферментативных реакций, связанных *общими промежуточными продуктами* (разд. 13.3);

Дополнение 14-2. Свободная энергия гидролиза АТР в интактных клетках

Стандартная свободная энергия гидролиза АТР равна $-7,3$ ккал/моль. Однако в клетке концентрации АТР, ADP и фосфата не только не равны между собой, но и намного ниже принятого для них стандартного значения 1 М (табл. 14-4). Кроме того, значение pH клеточного содержимого тоже может в какой-то мере отличаться от стандартного значения (7,0). Поэтому истинная свободная энергия гидролиза АТР в условиях, существующих внутри клетки, ΔG_p, не совпадает

со стандартной свободной энергией $\Delta G^{0\prime}$. Истинное изменение свободной энергии при гидролизе АТР в клетке (ΔG_p) нетрудно вычислить. В табл. 14-4 указаны концентрации АТР, ADP и P_i для эритроцитов человека: 2,25, 0,25 и 1,65 мМ соответственно. Примем для простоты, что pH и температура имеют стандартные значения (pH 7,0; температура 25°С). Истинная свободная энергия ΔG гидролиза АТР в эритроцитах определяется в этих условиях из уравнения

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + 2{,}303\ RT \lg \frac{[\mathrm{ADP}][\mathrm{P}_i]}{[\mathrm{ATP}]}.$$

Подставляя в это уравнение соответствующие значения, получаем

$$\Delta G = -7300 + 1360 \lg \frac{(2{,}50 \cdot 10^{-4})(1{,}65 \cdot 10^{-3})}{2{,}25 \cdot 10^{-3}} =$$

$$= -7300 + 1360 \lg 1{,}83 \cdot 10^{-4} = -7300 + 1360(-3{,}74) =$$

$$= -7300 - 5100 = -12\,400 \text{ кал/моль} = -12{,}4 \text{ ккал/моль}.$$

Мы видим, таким образом, что истинное изменение свободной энергии при гидролизе АТР в интактных эритроцитах (−12,4 ккал/моль) значительно превышает изменение стандартной свободной энергии (−7,3 ккал/моль). Еще одним доказательством этого служит тот факт, что при синтезе АТР из ADP и фосфата в эритроцитах изменение свободной энергии равно +12,4 ккал/моль.

Поскольку концентрации АТР, ADP и P_i в клетках разных типов различны (табл. 14-4), эти клетки отличаются друг от друга также и по величине ΔG_p гидролиза АТР. Более того, величина ΔG_p может меняться во времени в зависимости от метаболизма клетки, определяющего в ней концентрации АТР, ADP и фосфата, а также pH клеточного содержимого в каждый данный момент. Мы можем вычислить истинное изменение свободной энергии для любой метаболической реакции, протекающей в клетке, если нам известны концентрации всех исходных веществ и продуктов данной реакции, а также другие параметры (температура, pH или концентрация ионов Mg^{2+}), от которых зависит константа равновесия, а следовательно, и величина $\Delta G^{0\prime}$.

в такой последовательности продукт каждой предыдущей реакции служит субстратом для следующей. Например две реакции

$$A + B \longrightarrow C + D$$

$$D + E \longrightarrow F + G$$

связаны общим промежуточным продуктом D. При постоянной температуре и постоянном давлении химическая энергия может передаваться от одной химической реакции к другой только в том случае, если эти две реакции связаны общим промежуточным продуктом. В нашем примере с двумя реакциями промежуточный продукт D может служить переносчиком энергии от первой реакции ко второй.

АТР в клетке функционирует как общий промежуточный продукт, переносящий энергию и связывающий реакции, сопровождающиеся выделением свободной энергии, с теми, в которых потребляется свободная энергия. В процессе катаболизма за счет энергии, высвобождающейся при распаде органических питательных веществ клетки, образуются фосфорилированные соединения. При участии специфичного фермента из группы *киназ* фосфатная группа от тако-

го сверхвысокоэнергетического фосфорилированного соединения (обозначим его через X – Ⓟ) переносится на ADP, в результате чего образуется ATP. На втором этапе другая специфичная киназа переносит концевую фосфатную группу ATP на молекулу, выполняющую функцию акцептора фосфата (обозначим ее через Y), повышая тем самым ее энергию. В результате образуются молекулы Y – Ⓟ и ADP. Запишем обе реакции:

X—Ⓟ + ADP ⟶ X + ATP

ATP + Y ⟶ ADP + Y—Ⓟ

В итоге этих двух реакций, сопряженных через общий промежуточный продукт, ATP, химическая энергия передается от X – Ⓟ к Y посредством переноса фосфатной группы. В таких реакциях переноса фосфатных групп почти всегда посредником является ATP, поскольку клетки обычно не содержат киназ, способных осуществлять перенос фосфатных групп непосредственно от сверхвысокоэнергетических фосфорилированных соединений к низкоэнергетическим акцепторам.

14.12. При расщеплении глюкозы до лактата образуются два сверхвысокоэнергетических фосфорилированных соединения

В качестве доноров фосфатных групп для ADP важную роль играют два соединения: *3-фосфоглицероилфосфат* и *фосфоенолпируват* (табл. 14-5). Оба эти соединения образуются в процессе расщепления глюкозы до лактата (рис. 14-5), сопровождающемся выделением энергии. Об этом процессе, который называют *гликолизом*, мы будем говорить подробно в следующей главе. Значительная часть свободной энергии, высвобождающейся при расщеплении глюкозы до лактата, запасается в результате образования 3-фосфоглицероилфосфата и фосфоенолпирувата. В клетке эти высокоэнергетические фосфорилированные соединения не подвергаются гидролизу; вместо этого их фосфатные группы – при участии специфичных киназ – переносятся на ADP, в результате чего образуется ATP. Для 3-фосфоглицероилфосфата (рис. 14-6) такая реакция переноса фосфатной группы, катализируемая *фосфоглицераткиназой*, может быть записана в следующем виде:

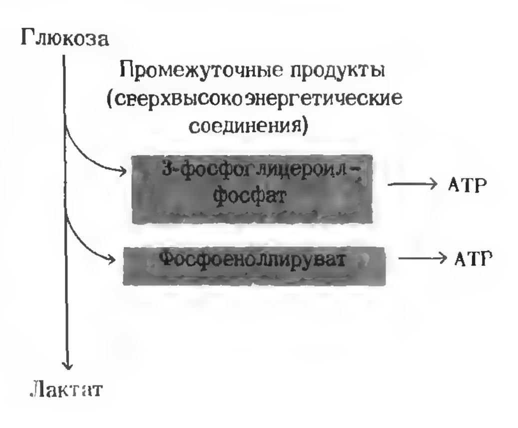


Рис. 14-5. Два вида сверхвысокоэнергетических фосфорилированных соединений, образующихся в качестве промежуточных продуктов при расщеплении глюкозы до лактата (которое сопровождается выделением энергии). Оба эти соединения способны передавать свою фосфатную группу на ADP, в результате чего образуется ATP.

3-фосфоглицероилфосфат + ADP ⇌
⇌ ATP + 3-фосфоглицерат.

На ADP переносится при этом только одна из двух фосфатных групп фосфоглицероилфосфата, а именно та, которая связана с углеродом карбоксильной группы. (Отщепление второй фосфатной группы, при С-3, характеризуется небольшой величиной $\Delta G^{0\prime}$.) Рассматриваемая киназная реакция обратима, однако при стандартных условиях ее равновесие сильно сдвинуто вправо, поскольку $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза 3-фосфоглицероилфосфата (– 11.8 ккал/моль) больше, чем $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза ATP (– 7,3 ккал/моль).

Фосфоенолпируват – второе высокоэнергетическое фосфорилированное соединение, образующееся при расщеплении глюкозы до лактата, – также отдает свою фосфатную группу молекуле ADP в аналогичной реакции (рис. 14-7), катализируемой *пируваткиназой*.

Низкоэнергетическая группа — Высокоэнергетическая группа

$^{-}O-P(=O)(O^{-})-O-\overset{3}{C}H_2-\overset{2}{C}H(OH)-\overset{1}{C}(=O)-O-P(=O)(O^{-})-O^{-}$ 3-фосфоглицероилфосфат

+

ADP^{3-}

Mg^{2+} ⇅ Фосфоглицераткиназа

$^{-}O-P(=O)(O^{-})-O-CH_2-CH(OH)-C(=O)-O^{-}$ 3-фосфоглицерат

+

ATP^{4-}

Рис. 14-6. Перенос фосфатной группы от 3-фосфоглицероилфосфата на ADP.

Фосфоенолпируват +

$$+ ADP \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{Пируват} + ATP.$$

Равновесие этой реакции при стандартных условиях также сдвинуто вправо, поскольку $\Delta G^{0'}$ гидролиза фосфоенолпирувата (−14,8 ккал/моль) более чем вдвое превышает $\Delta G^{0'}$ гидролиза АТР. В клетке эта реакция необратима. Таким образом, и фосфоенолпируват, и 3-фосфоглицероилфосфат, т.е. оба соединения, заключающие в себе значительную часть химической энергии, высвобождающейся при анаэробном расщеплении глюкозы, могут передавать существенную долю своей энергии молекулам ADP, что приводит к образованию АТР.

$CH_2=C(-O-P(=O)(O^{-})-O^{-})-COO^{-}$ Фосфоенолпируват

+

ADP^{3-}

Mg^{2+} ⇅ Пируваткиназа

$CH_3-C(=O)-COO^{-}$ Пируват

+

ATP^{4-}

Рис. 14-7. Перенос фосфатной группы от фосфоенолпирувата на ADP.

14.13. В результате переноса фосфатной группы от АТР на какую-нибудь акцепторную молекулу этой молекуле сообщается энергия

АТР может теперь передавать свою фосфатную группу различным акцепторным молекулам с образованием низкоэнергетических фосфорилированных соединений, главным образом эфиров фосфорной кислоты (табл. 14-5). Эти реакции также катализируются киназами. *Гексокиназа*, например, катализирует перенос фосфатной группы от АТР к D-глюкозе

$$ATP + \text{D-глюкоза} \xrightarrow{Mg^{2+}} ADP + \text{D-глюкозо-6-фосфат},$$

α-D-глюкозо-6-фосфат

L-глицерол-3-фосфат

Рис. 14-8. Два низкоэнергетических фосфорилированных соединения. Они представляют собой сложные эфиры – продукты присоединения остатка фосфорной кислоты к гидроксильной группе.

а *глицеролкиназа* катализирует реакцию

$$\text{ATP} + \text{Глицерол} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{Глицерол-3-фосфат}.$$

В обоих случаях одна из гидроксильных групп молекулы-акцептора фосфорилируется с образованием эфира фосфорной кислоты (рис. 14-8). Поскольку значения $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза глюкозо-6-фосфата ($\Delta G^{0\prime} = -3{,}3$ ккал/моль) и глицерол-3-фосфата ($\Delta G^{0\prime} = -2{,}2$ ккал/моль) меньше $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза ATP, обе указанные реакции при исходных концентрациях субстратов и реагентов 1,0 М протекают слева направо в соответствии с приведенными выше уравнениями.

Глюкозо-6-фосфат и глицерол-3-фосфат содержат больше энергии, чем свободные (нефосфорилированные) глюкоза и глицерол. Мы можем поэтому рассматривать их как «обогащенные энергией» (энергизованные) формы глюкозы и глицерола. Они могут вовлекаться в другие ферментативные реакции, в которых они используются в качестве активированных строительных блоков для синтеза более крупных молекул. Глюкозо-6-фосфат, например, играет роль активированного предшественника в процессе биосинтеза гликогена, а глицерол-3-фосфат используется как активированный строительный блок при биосинтезе липидов. Таким образом, часть свободной энергии, высвободившейся первоначально при расщеплении глюкозы до лактата и запасенной в форме 3-фосфоглицероилфосфата и фосфоенолпирувата, может быть передана глицеролу, глюкозе и некоторым другим акцепторам фосфата;

Рис. 14-9. Перенос фосфатных групп от сверхвысокоэнергетических фосфорилированных соединений (доноров фосфата) через ATP к различным соединениям-акцепторам с образованием низкоэнергетических фосфорилированных производных этих соединений. Этот перенос фосфатных групп, катализируемый киназами, сопровождается в конечном итоге в условиях клетки потерей свободной энергии. Креатинфосфат в мышечных и нервных клетках служит резервным источником высокоэнергетических фосфатных групп.

Стандартная свободная энергия гидролиза, ккал/моль
−16
−14
−12
−10
−8
−6
−4
−2
0
Сверхвысокоэнергетические доноры фосфатных групп
Фосфоенолпируват
3-Фосфоглицероилфосфат
~P
~P
ATP
~P
Креатинфосфат
~P
~P
Глюкозо-6-фосфат
Глицерол-3-фосфат
Низкоэнергетические акцепторы фосфатных групп

АТР служит при этом промежуточным переносчиком химической энергии в форме фосфатных групп.

Протекающие в клетке ферментативные реакции переноса фосфатных групп представлены на рис. 14-9. Важная особенность этого переноса состоит в том, что почти все сверхвысокоэнергетические фосфорилированные соединения передают свои фосфатные группы низкоэнергетическим акцепторам фосфата через АТР, так что передача совершается в два этапа; оба эти этапа катализируются специфичными киназами.

14.14. АТР используется для обеспечения энергией мышечного сокращения

АТР не только обогащает энергией молекулы-предшественники и тем самым подготавливает материал для биосинтеза различных клеточных компонентов; он также поставляет химическую энергию для двух главных форм выполняемой клеткой работы: для *механической работы*, связанной с мышечным сокращением, и для *осмотической работы*, обеспечивающей транспорт веществ против градиента концентрации.

Сократительная система скелетных мышц включает нити двух типов (рис. 14-10). Толстые нити состоят из пучков, образованных параллельно расположенными палочковидными молекулами *миозина*, а тонкие состоят из двух закрученных одна вокруг другой нитей *фибриллярного актина* (F-актина). F-актин в свою очередь состоит из молекул глобулярного актина (G-актина), соединенных наподобие нитки бус. В миофибриллах толстые и тонкие нити располагаются упорядоченным образом; в *саркомерах* (так называются повторяющиеся участки миофибрилл) они расположены параллельно и в большей или меньшей мере перекрываются. При мышечном сокращении толстые нити каждого саркомера вдвигаются в промежутки между тонкими нитями, благодаря чему все мышечное волокно в целом укорачивается. Химическую энергию для такого скольжения нитей поставляет процесс гидролиза АТР до ADP и фосфата. На рис. 14-10 видно, что у каждой миозиновой молекулы толстой нити имеется головка. Эти головки миозиновых молекул, равномерно распределенные вдоль толстых нитей, представляют собой не что иное, как ферменты. Многократно приходя в контакт с тонкими нитями, они вызывают гидролиз АТР, в результате чего благодаря скользящему усилию толстые нити смещаются вдоль тонких к концам саркомера. Гидролиз АТР сопровождается, как полагают, изменением формы, или конформации головки миозиновой молекулы, что и приводит к возникновению механической силы. Таким способом миозин и актин, а также другие специализированные белки сократительной системы переводят химическую энергию АТР в механическую энергию мышечного сокращения.

Сокращение и расслабление скелетных мышц регулируется концентрацией Ca^{2+} в цитозоле. В состоянии покоя концентрация Ca^{2+} в мышце обычно очень низка. При стимуляции мышечного волокна импульсами двигательного нерва Ca^{2+} высвобождается из поперечных мембранных трубочек мышечной клетки. Этот высвободившийся Ca^{2+} связывается со сложным регуляторным белком тропонином, молекулы которого присоединены через определенные промежутки к тонким нитям. Молекулы тропонина играют роль триггера, т. е. пускового механизма. Они претерпевают конформационное изменение, которое оказывает влияние на миозиновые головки в толстых нитях. В них возбуждается АТРазная активность и таким образом инициируется сокращение. Тропонин остается активным до тех пор, пока в цитозоле мышечного волокна присутствует Ca^{2+}. Расслабление мышцы происходит после того, как нервные импульсы перестают к ней поступать и Ca^{2+} за счет действия находящейся в мембране АТРазы, выполняющей роль кальциевого насоса, переносится из саркоплазмы в цистерны саркоплазматического ретикулума. Таким образом, АТР необходим не только для сокращения мышц, но и для их расслабления. Позже мы уви-

Рис. 14-10. Сократительная система скелетных мышц. *А*. Скелетная мышца состоит из пучков параллельных мышечных волокон. Эти волокна представляют собой очень длинные многоядерные клетки. *Б*. В каждом мышечном волокне содержится множество миофибрилл – пучков параллельно расположенных нитей. Миофибриллы разделены особыми темными участками (Z-линиями) на саркомеры. *В*. Каждый саркомер состоит из правильно расположенных толстых и тонких нитей. Толстые нити могут скользить вдоль тонких. *Г*. Толстые нити слагаются из пучков длинных палочковидных молекул белка миозина. Каждая молекула миозина состоит из двух α-спиральных полипептидных цепей, закрученных одна вокруг другой. Один из концов полипептидной цепи (головка) имеет глобулярную структуру; это фермент, катализирующий гидролиз ATP до ADP и P_i. *Д*. Каждая тонкая нить состоит из двух цепей F-актина, закрученных одна вокруг другой в спираль. Каждая такая цепь составлена из глобулярных молекул G-актина, соединенных друг с другом наподобие ниток бус. *Е*. Глобулярные миозиновые головки выступают из толстых нитей. Предполагается, что в присутствии ATP эти миозиновые головки действуют как рычаги. Прикрепляясь к тонким нитям и притягивая их к центру саркомера, они укорачивают саркомеры, в результате чего миофибриллы сокращаются. Одновременно миозиновые головки осуществляют гидролиз ATP до ADP и P_i. Этот процесс мышечного сокращения регулируется особым Ca^{2+}-связывающим белком, тропонином, молекулы которого присоединены через равные промежутки к актиновым нитям.

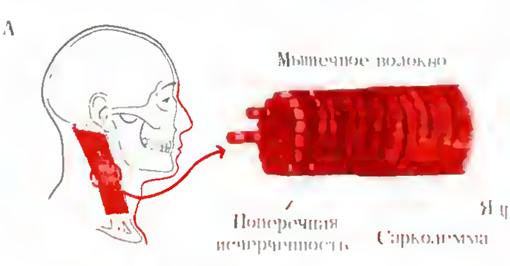




Рис. 14-11. Благодаря хорошо скоординированной работе мощных скелетных мышц гепард способен на расстоянии в несколько сотен метров развивать скорость до 125 км/ч.

дим, что и для переноса других ионов через мембрану также используется энергия, высвобождающаяся при гидролизе АТР.

Мышцы различаются по своей специализации. Гладкие мышцы кишечника, например, сокращаются крайне медленно, тогда как для летательных мышц таких насекомых, как мухи или комары, характерна чрезвычайно высокая частота сокращения и расслабления. Есть мышцы, способные «запираться» в состоянии сокращения. Таковы, например, запирающие мышцы, или мышцы-аддукторы двустворчатых моллюсков, в частности устриц.

Для сердечной мышцы характерны ритмические сокращения. Скелетные мышцы в свою очередь разделяются на ряд специализированных групп. Белая скелетная мышца принадлежит к «быстрым» мышцам, которые могут работать без кислорода, тогда как для работы красной скелетной мышцы, которая сокращается медленно, кислород необходим. У некоторых животных мышцы необычайно мощные и работают очень эффективно (рис. 14-11). Однако независимо от специализации мышц молекулярными компонентами их сократительных элементов всегда являются актин, миозин и тропонин; источником же энергии для мышечного сокращения всегда служит АТР. Движения другого типа (гл. 2) осуществляются с помощью ресничек и жгутиков, имеющихся у некоторых эукариотических клеток (рис. 14-12). Расхождение хромосом при митозе, вызываемое сокращением нитей веретена, также совершается за счет энергии АТР, обеспечивающей скручивание и скольжение микротрубочек относительно друг друга.

Система актин – миозин – тропонин представляет собой уникальный тип химического двигателя, поскольку она осуществляет непосредственное преобразование химической энергии в механическую при постоянной температуре и постоянном давлении. Ни одна из созданных человеком машин к подобному преобразованию энергии, насколько нам известно, не способна. В живых организмах, следовательно, существует такой тип преобразования энергии, который инженерам пока еще осуществить не удалось.

14.15. Креатинфосфат в мышцах выполняет роль резервуара высокоэнергетических фосфатных групп

Среди высокоэнергетических фосфорилированных соединений имеется одно, играющее особую роль в энергетике возбудимых тканей, таких, как мышечная и нервная. Это соединение, креатинфосфат, или фосфокреатин (рис. 14-13), служит резервуаром высокоэнергетических фосфатных групп. $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза креатинфосфата (– 10,3 ккал/моль) несколько превышает $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза АТР. Креатинфосфат может передавать свою фос-

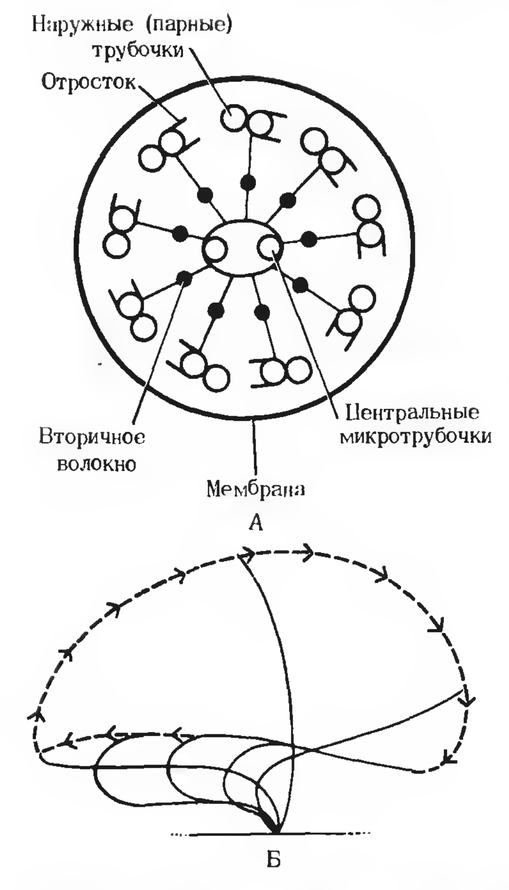


Рис. 14-12. В ресничках и жгутиках эукариотических клеток механическая сила развивается за счет использования АТР. *А*. Поперечный разрез реснички. Эти структуры состоят из девяти пар микротрубочек, образующих наружное кольцо, и двух одиночных центральных микротрубочек (расположение по типу «9 + 2»; разд. 2.16). Реснички окружены оболочкой, представляющей собой вырост клеточной мембраны. Энергию для характерных движений ресничек (волнообразного, скользящего или вращательного) поставляет гидролиз АТР. Эти движения осуществляются ресничками за счет скольжения или скручивания парных микротрубочек, которое весьма напоминает наблюдаемое в скелетных мышцах АТР-зависимое скольжение толстых и тонких нитей друг относительно друга. От наружных (парных) микротрубочек отходят находящиеся на равном расстоянии друг от друга отростки, или выступы, напоминающие миозиновые головки в толстых нитях мышц. Эти выступы состоят из молекул динеина – довольно крупного белка, обладающего АТРазной активностью. Катализируемый динеином гидролиз АТР поставляет энергию для механического движения – скольжения или скручивания микротрубочек. Было высказано предположение, что центральные микротрубочки регулируют скорость движения ресничек. *Б*. Отдельные фазы биения реснички в жабрах морского червя, у которого реснички имеют длину около 30 мкм. Эти характерные движения сообщает ресничкам АТР-зависимое скольжение трубчатых нитей друг относительно друга.

фатную группу на ADP в реакции, катализируемой *креатинкиназой*:

Креатинфосфат +
+ ADP ⇌ Креатин + АТР.

Благодаря креатинфосфату концентрация АТР в мышечных клетках поддерживается на постоянном и притом довольно высоком уровне. Особенно это существенно для скелетных мышц, работающих с перерывами, но иногда очень напряженно с большой скоростью. Всякий раз, когда часть АТР мышечной клетки расходуется на сокращение, в результате гидролиза АТР образуется ADP. Креатинфосфат при участии креатинкиназы быстро передает свою фосфатную группу молекулам ADP, и нормальный уровень АТР восстанавливается. Содержание креатинфосфата в мышцах в 3–4 раза превышает содержание АТР (табл. 14-4); поэтому в форме креатинфосфата может

$^{-}O-P(O)(O)-NH-C(=NH_2^{+})-N(CH_3)-CH_2-C(=O)-O^{-}$ Креатинфосфат

+

ADP

⇅ Креатинкиназа

$H-NH-C(=NH_2^{+})-N(CH_3)-CH_2-C(=O)-O^{-}$ Креатин

+

ATP

Рис. 14-13. Креатинфосфат в мышцах играет роль запасного донора высокоэнергетических фосфатных групп. Он действует как своеобразный буфер, обеспечивающий постоянство концентрации АТР.

храниться достаточное количество фосфатных групп, полностью обеспечивающее поддержание постоянного уровня АТР в короткие периоды усиленной мышечной активности. Благодаря обратимости креатинкиназной реакции накопившийся креатин в период восстановления вновь фосфорилируется за счет АТР до креатинфосфата. Поскольку другого метаболического пути для образования и расщепления креатинфосфата не существует, это соединение хорошо приспособлено для выполнения своей функции - резервуара фосфатных групп.

В мышцах многих беспозвоночных роль носителя резервной формы энергии выполняет не креатинфосфат, а *аргининфосфат*. Соединения, служащие, подобно креатинфосфату и аргининфосфату, запасными источниками энергии, носят название *фосфагенов*.

14.16. АТР поставляет энергию также и для активного транспорта через мембраны

Химическая энергия АТР используется также и для выполнения осмотической работы, т.е. работы, необходимой для переноса каких-либо ионов или молекул через мембрану из одного компартмента в другой, в котором их концентрация выше. Мы можем рассчитать количество свободной энергии, необходимое для переноса 1 моль неионизованного растворенного вещества через мембрану, например из окружающей среды в клетку, если нам известны концентрации растворенного вещества в несвязанной форме в окружающей среде и в клетке (рис. 14-14). Для такого расчета воспользуемся общим уравнением

$$\Delta G = 2{,}303\, RT \lg \frac{C_2}{C_1},$$

где C_1 - молярная концентрация данного растворенного вещества в окружающей среде, C_2 - его молярная концентрация в клетке, R - газовая постоянная и T - абсолютная температура. Пользуясь этим уравнением, можно определить количество свободной энергии, необходимое для того, чтобы переместить 1 моль глюкозы против стократного градиента концентрации, например из среды с исходной концентрацией глюкозы 1,0 мМ в компартмент, где ее конечная концентрация составит 100 мМ. Подставляя в уравнение соответствующие значения, получаем

$$\Delta G = 2{,}30 \cdot 1{,}98 \cdot 298 \cdot \lg \frac{0{,}100}{0{,}001} =$$

$$= 1360 \cdot 2{,}0 = 2720 \text{ кал/моль} =$$

$$= 2{,}72 \text{ ккал/моль}.$$

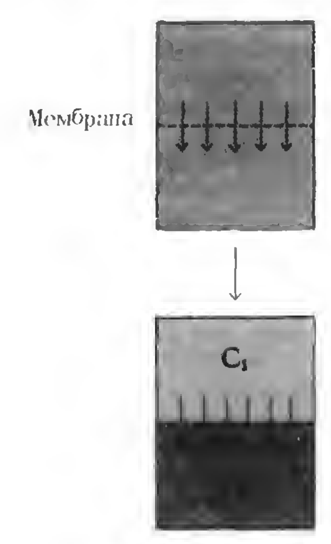


Рис. 14-14. Активный транспорт растворенного вещества против градиента концентрации. Начиная с момента равновесия, т.е. с того момента, когда концентрации данного растворенного вещества в обоих компартментах одинаковы, активный транспорт вещества из одного компартмента в другой обеспечивает его перемещение против градиента концентрации. Для создания и поддержания градиента концентрации какого-либо растворенного вещества между компартментами, находящимися по обе стороны мембраны, требуется затрата свободной энергии. Если энергия почему-либо перестает поступать, то вещество из компартмента с более высокой его концентрацией начинает диффундировать обратно, и диффузия продолжается до тех пор, пока снова не установится равновесие, т.е. пока концентрации вещества по обе стороны мембраны не сравняются.

Изменение свободной энергии выражается в этом случае положительной величиной, и это значит, что 2,72 ккал свободной энергии, которые требуются для переноса 1 моля глюкозы (или любого нейтрального вещества) против стократного градиента концентрации, должны быть переданы системе за счет какой-то сопряженной реакции, способной служить источником энергии.

Градиенты концентрации между двумя сторонами клеточных мембран (трансмембранные градиенты) варьируют очень сильно. Пожалуй, максимальный градиент концентрации в организме поддерживается плазматической мембраной *обкладочных клеток* слизистой оболочки желудка, секретирующих соляную кислоту в желудочный сок. Концентрация HCl в желудочном соке может достигать 0,1 М (pH 1,0), тогда как концентрация ионов H^+ в клетках составляет приблизительно 10^{-7} М (pH 7,0). Это означает, что обкладочные клетки обладают способностью секретировать ионы водорода даже против градиента порядка $10^6:1$. По-видимому, эти клетки имеют какие-то очень активные мембранные «насосы» для секреции ионов водорода, так как для поддержания столь высокого градиента концентрации требуется значительное количество энергии. Перенос веществ через мембраны против градиента концентрации называют *активным транспортом*. Образование желудочной HCl стимулируется особым, связанным с мембраной ферментом – так называемой *H^+-транспортирующей АТРазой*. При образовании желудочного сока на каждую молекулу цитозольного АТР, гидролизованного до ADP и фосфата, из цитозоля наружу через плазматическую мембрану выводятся два иона H^+.

Другим важным примером активного транспорта может служить перенос ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану во всех животных клетках. Лучше всего изучен этот процесс в эритроцитах. Установлено, что концентрация K^+ в цитозоле эритроцитов достигает примерно 110 мМ, тогда как в плазме крови она составляет всего 3 мМ. В то же время концентрация Na^+ в плазме крови достигает 140 мМ, а в эритроцитах она равна приблизительно 4 мМ. Для поддержания столь высоких трансмембранных градиентов требуется энергия АТР. В мембране эритроцита содержится специализированный фермент, получивший название *Na^+, K^+-транспортирующей АТРазы*, который функционирует и как фермент, и как молекулярный насос. Эта АТРаза катализирует гидролитическое расщепление АТР до ADP и фосфата, а высвобождающуюся при этом свободную энергию использует для перекачивания ионов K^+ из окружающей среды внутрь клетки, а ионов Na^+ из клетки в окружающую среду (рис. 14-15). Стадией, на которой происходит передача энергии в этом процессе, является перенос концевой фосфатной группы АТР на молекулу Na^+, K^+-АТРазы. На следующей стадии связанная с ферментом фосфатная груп-

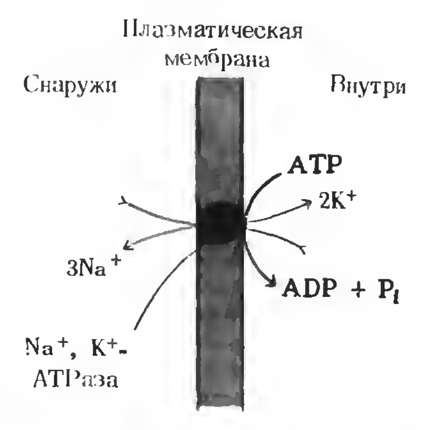


Рис. 14-15. Схема, поясняющая действие Na^+, K^+-АТРазы. Для транспорта K^+ в клетку (где его концентрация выше, чем в окружающей среде) и транспорта Na^+ из клетки в окружающую среду (где концентрация этих ионов выше, чем в клетке) требуется свободная энергия. Источником ее служит гидролиз АТР. На каждую молекулу АТР, гидролизованного до ADP и P_i, из клетки выходят три иона Na^+ и два иона K^+ поступают в нее из окружающей среды. Этот транспорт ионов включает два этапа. На первом этапе молекула АТРазы фосфорилируется под действием АТР, и это позволяет ей присоединить ион Na^+. На втором этапе присоединяется ион K^+, следствием чего оказывается перенос Na^+ и K^+ через мембрану с отщеплением свободного фосфата, поступающего в цитозоль. АТР и продукты его гидролиза (ADP и P_i) остаются в клетке.

па отщепляется и в виде неорганического фосфата переходит в цитозоль, обеспечивая энергией перенос Na^+ и K^+ через мембрану в противоположных направлениях, но в обоих случаях против градиента концентрации. Продукты этого процесса, ADP и фосфат, вновь «заряжаются», т. е. образуют АТР, за счет энергии, выделяющейся при расщеплении глюкозы. Na^+, K^+-АТРаза гидролизует АТР лишь в том случае, если в клетке имеются ионы Na^+, а в окружающей среде – ионы K^+. Молекула Na^+, K^+-АТРазы, состоящая из двух α- и двух β-субъединиц, насквозь пронизывает плазматическую мембрану. Во время переноса ионов она претерпевает конформационное изменение. В почках, где ионы Na^+ переходят в мочу, а ионы K^+ должны удерживаться в крови, на активный перенос этих ионов расходуется почти две трети всего АТР, образующегося в процессе дыхания. В различных клеточных мембранах важную роль играют АТРазы, транспортирующие другие ионы (табл. 14-6).

14.17. АТР может расщепляться также до АМР и пирофосфата

Хотя в клеточных реакциях используемый АТР расщепляется обычно до ADP и фосфата (P_i), а непосредственным акцептором фосфата в реакциях, сопровождающихся выделением энергии, служит ADP, известны и такие клеточные реакции, в которых от молекулы АТР отщепляются в виде одного фрагмента обе его концевые фосфатные группы, β и γ (рис. 14-2); продуктами расщепления оказываются в этом случае неорганический пирофосфат (PP_i) и аденозинмонофосфат (АМР). Примером такой реакции может служить ферментативная активация жирных кислот с образованием их СоА-производных (рис. 18-2); жирная кислота приобретает при этом энергию и превращается в соответствующее *СоА-производное* (рис. 14-16), используемое затем в качестве активированного предшественника при биосинтезе липидов;

Таблица 14-6. Мембранные АТРазы, транспортирующие различные катионы

Название фермента	Тип клеток	Локализация	Функция
Na^+, K^+-АТРаза	Большинство животных клеток	Плазматическая мембрана	Поддерживает высокую внутриклеточную концентрацию K^+
H^+-АТРаза	Обкладочные клетки слизистой желудка	То же	Секретирует H^+ в желудочный сок
H^+-АТРаза	Животные и растительные клетки	Внутренняя мембрана митохондрий	Участвует в окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании ADP до АТР
	Растительные клетки	Внутренняя мембрана хлоропластов	
	Бактерии	Плазматическая мембрана	
Ca^{2+}-АТРаза	Животные клетки	То же	Выкачивает ионы Ca^{2+} из клеток, способствуя накоплению этих ионов в цитозоле
		Саркоплазматический ретикулум	Накачивает ионы Ca^{2+} в цистерны саркоплазматического ретикулума, вызывая расслабление мышцы

$$\text{ATP} + \underset{\substack{\text{Жирная}\\ \text{кислота}}}{\text{RCOOH}} + \text{CoA—SH} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{AMP} + \text{PP}_i + \underset{\substack{\text{CoA-производное}\\ \text{жирной кислоты}}}{\text{RCO—S—CoA}}$$

$$\Delta G^{0\prime} = +0{,}2 \text{ ккал/моль}$$

Эта реакция активации сопровождается *пирофосфатным расщеплением* АТР, продуктами которого являются пирофосфат и AMP; при обычном же *ортофосфатном расщеплении* от АТР отщепляется

CH₃–(CH₂)₁₄–C(=O)–S–Кофермент А

Пальмитоильная группа

Рис. 14-16. Пальмитоилкофермент А может служить типичным примером СоА-производного жирной кислоты. Гидролиз с разрывом тиоэфирной связи (C—S-связи) между жирной кислотой и коферментом А характеризуется высоким значением $\Delta G^{0\prime}$, равным приблизительно $-7{,}5$ ккал/моль. СоА-производные жирных кислот играют роль активированных предшественников в процессе биосинтеза липидов.

только одна ортофосфатная группа, как, например, в гексокиназной реакции

$$\text{ATP} + \text{D-глюкоза} \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{ADP} + \text{D-глюкозо-6-фосфат}$$

$$\Delta G^{0\prime} = -3{,}3 \text{ ккал/моль}$$

Гидролиз АТР до AMP и PP_i

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$

характеризуется величиной $\Delta G^{0\prime} = -7{,}7$ ккал/моль, что несколько превышает $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза концевой, или γ-фосфатной, связи. Неорганический пирофосфат затем гидролизуется при участии *пирофосфатазы* с образованием двух молекул неорганического ортофосфата.

$$\text{Пирофосфат} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Фосфат}$$

$$\Delta G^{0\prime} = -6{,}9 \text{ ккал/моль.}$$

Суммарная реакция описывается уравнением

$$\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + 2\text{P}_i$$

$$\Delta G^{0\prime} = -14{,}6 \text{ ккал/моль.}$$

Величина $\Delta G^{0\prime}$ этой суммарной реакции равна алгебраической сумме величин $\Delta G^{0\prime}$ двух ее последовательных стадий. Нетрудно видеть, что величина $\Delta G^{0\prime}$ суммарной реакции ровно вдвое превышает величину $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза концевых фосфатных групп АТР и ADP.

Расходование двух фосфатных групп АТР на активацию одной молекулы предшественника может показаться расточительством, т.е. может сложиться впечатление, что энергия фосфатных групп расходуется в этом случае неэкономно. Позже мы увидим, однако, что за этим кроется важный механизм, обеспечивающий завершение некоторых биосинтетических реакций. Необычным образом используется пирофосфатное расщепление АТР, например, светляками: оно служит им источником энергии для испускания света (дополнение 14-3).

AMP возвращается в АТР-цикл благодаря действию особого фермента, присутствующего во всех животных клетках. Этот фермент, *аденилаткиназа*, катали-

зирует обратимое фосфорилирование AMP до ADP:

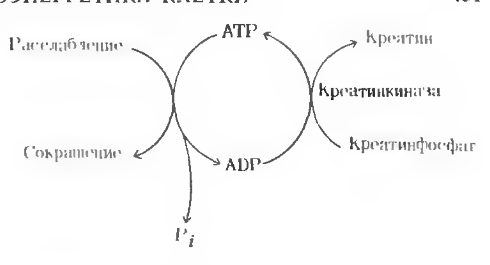
$$ATP + AMP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} ADP + ADP.$$

Образующийся при этом ADP может затем опять фосфорилироваться до АТР.

У аденилаткиназы есть еще одна важная функция: этот фермент способствует поддержанию уровня АТР в клетке, когда катализируемая им реакция протекает в обратном направлении

$$2ADP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} ATP + AMP,$$

т. е. когда он катализирует перенос концевой фосфатной группы от одной молекулы ADP к другой, которая при этом превращается в АТР. Таким образом в сокращающихся мышцах аденилаткиназа позволяет использовать в качестве источника энергии две фосфатные группы АТР, γ и β (рис. 14-17). Следовательно, действуя на ADP, аденилаткиназа может пополнять запас креатинфосфата, который во время мышечного сокращения служит источником АТР.



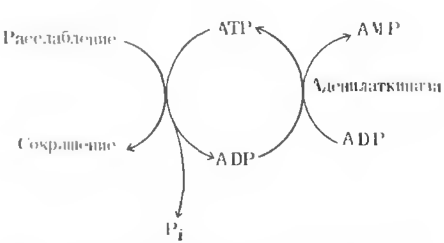


Рис. 14-17. Два процесса, обеспечивающие поддержание соответствующего уровня АТР в быстро сокращающихся скелетных мышцах, работающих в условиях анаэробиоза.

Дополнение 14-3. АТР поставляет энергию для биолюминесценции светляков

Биолюминесценция, для которой требуются значительные количества энергии, свойственна многим видам грибов, морским микроорганизмам, медузам, ракообразным и светлякам (рис. 1). У светляков в последовательности реакций, обеспечивающих преобразование химической энергии в энергию света, используется сочетание энергии АТР и окислительной энергии. Уильям Мак-Элрой и его коллеги из Университета Джона Гопкинса выделили из многих тысяч светляков, собранных для этой цели по их просьбе детьми в окрестностях Балтимора, два главных биохимических компонента, участвующих в процессе свечения: *люциферин* (рис. 2), представляющий собой карбоновую кислоту довольно сложного строения, и фермент *люциферазу*. Для ге-



Рис. 1. Светляк.

Люциферин

Люцифериладенилат

AMP

Рис. 2. Главные компоненты, обеспечивающие биолюминесценцию светляков.

нерации световых вспышек люциферин сначала должен быть активирован в ферментативной реакции с ATP. На этой стадии пирофосфатное расщепление ATP приводит к образованию *люцифериладенилата* (рис. 2). Затем под действием молекулярного кислорода происходит катализируемое люциферазой окислительное декарбоксилирование люциферина, в результате чего образуется *оксилюциферин*. Именно эта реакция, протекающая через ряд промежуточных стадий, сопровождается световыми вспышками (рис. 3). Спектральный состав испускаемого света у разных видов светляков различен; он зависит, по всей вероятности, от структуры люциферазы. Завершается цикл последовательностью реакций, в результате которых из оксилюциферина вновь образуется люциферин. У других биолюминесцентных организмов свечение обусловливается ферментативными реакциями иного типа.

Люцифериладенилат, O_2, Люцифераза, Свет, PP_i, ATP, CO_2 + AMP, Люциферин, Оксилюциферин, Реакции, приводящие к регенерации люциферина

Рис. 3. Циклическое превращение компонентов, обеспечивающих люминесценцию светляка.

Очищенные люциферин и люциферазу светляков используют для измерения очень малых количеств ATP. Мерой количества ATP служит при этом интенсивность световой вспышки. Таким способом удается определять количества ATP порядка нескольких пикомолей (10^{-12} моль).

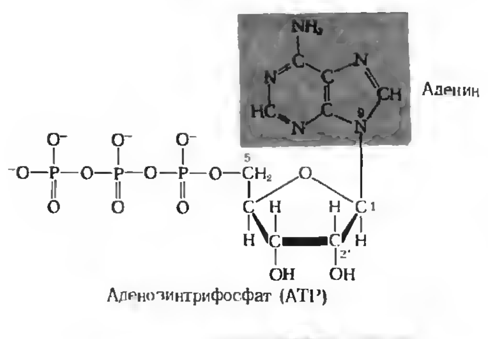


Рис. 14-18. *А*. Четыре нуклеозид-5′-трифосфата. Каждый из них содержит особое основание (показано на красном фоне). *Б*. В молекуле дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов в положении 2′ вместо гидроксила стоит атом водорода. Дезокситимидинтрифосфат служит предшественником остатков тимидиловой кислоты, входящих в состав ДНК. В РНК остатков тимидиловой кислоты нет; вместо них здесь присутствуют остатки уридиловой кислоты (ее предшественником служит уридинтрифосфат).

Гуанин
Гуанозинтрифосфат (GTP)

Аденин
Дезоксиаденозинтрифосфат (dATP)

Цитозин
Цитидинтрифосфат (CTP)

Тимин
Дезокситимидинтрифосфат (dTTP)

Б

Урацил
Уридинтрифосфат (UTP)

А

14.18. Помимо АТР есть и другие высокоэнергетические нуклеотид-5′-трифосфаты

Уридинтрифосфат (UTP), *гуанозинтрифосфат* (GTP) и *цитидинтрифосфат* (CTP) представляют собой фосфорилированные рибонуклеотиды, по своей структуре сходные с АТР (рис. 14-18) и характеризующиеся такой же величиной $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза. Эти соединения содержатся во всех клетках, хотя и в значительно меньших количествах, чем АТР. В малых концентрациях обнаруживаются в клетках также и соответствующие дезоксирибонуклеозид - 5′ - трифосфаты: *2′-дезоксиаденозин-5′-трифосфат* (dATP), *2′-дезоксигуанозин-5′-трифосфат* (dGTP), *2′-дезоксицитидин-5′-трифосфат* (dCTP) и *2′-дезокситимидин-5′-трифосфат* (dTTP). АТР в клетке играет роль главно-

го переносчика фосфатных групп. Что же касается перечисленных здесь других нуклеозид-5'-трифосфатов, то все они выполняют специализированные функции, обслуживая только строго определенные биосинтетические пути. Свои концевые фосфатные группы они получают от АТР в реакциях, катализируемых Mg^{2+}-зависимыми ферментами, которые носят название *нуклеозиддифосфокиназ*. Эти ферменты катализируют следующие обратимые реакции:

$$ATP + UDP \rightleftharpoons ADP + UTP$$

$$ATP + GDP \rightleftharpoons ADP + GTP$$

$$ATP + CDP \rightleftharpoons ADP + CTP$$

$$GTP + UDP \rightleftharpoons GDP + UTP$$

$$ATP + dCDP \rightleftharpoons ADP + dCTP$$

$$GTP + dADP \rightleftharpoons GDP + dATP$$

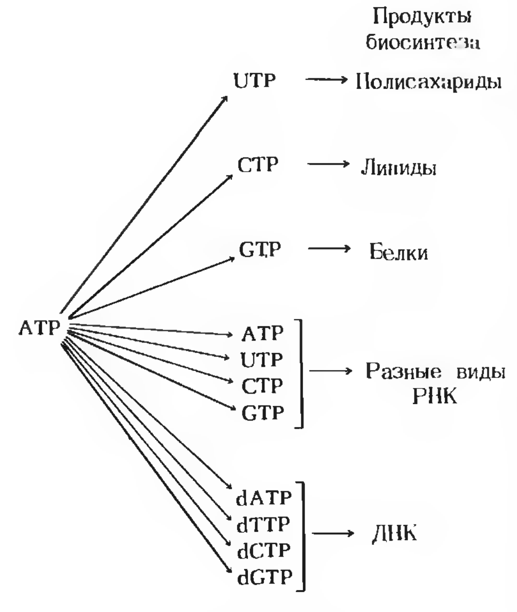


Рис. 14-19. Различные нуклеозид- и дезоксинуклеозидтрифосфаты служат теми каналами, через которые энергия АТР направляется на биосинтез тех или иных клеточных компонентов.

На рис. 14-19 показано, как через эти различные нуклеозид- и дезоксинуклеозидтрифосфаты энергия и строительные блоки передаются на определенные метаболические пути, где они используются для биосинтеза липидов, белков и в первую очередь для биосинтеза ДНК и РНК.

14.19. Система АТР функционирует в стационарно-динамическом режиме

Как можно убедиться в том, что система АТР действительно функционирует в интактных клетках, осуществляя перенос энергии фосфатных групп (см. рис. 14-3)? Ответ на этот вопрос мы можем получить в экспериментах с соединениями, меченными радиоактивным изотопом фосфора ^{32}P. Можно, например, используя неорганический фосфат, меченный ^{32}P, определить оборачиваемость концевой фосфатной группы АТР в клетках или тканях. С этой целью в дышащие клетки вводят меченый неорганический фосфат, после чего через короткие промежутки времени отбирают пробы клеток и выделяют из них АТР. Выяснилось, что хотя концентрация АТР в клетках при этом не меняется, в его концевой фосфатной группе уже через короткое время обнаруживается радиоактивность, а это свидетельствует о том, что концевая фосфатная группа (γ-группа) быстро отщепляется и столь же быстро замещается радиоактивным фосфатом из пула неорганического фосфата. Этот процесс обновления концевой фосфатной группы АТР продолжается до тех пор, пока ее удельная радиоактивность не сравняется с удельной радиоактивностью пула неорганического фосфата. Оборачиваемость концевой фосфатной группы АТР очень высока. В дышащих клетках печени период полуоборота концевой фосфатной группы АТР не превышает одной-двух минут, а у аэробных бактериальных клеток, у которых интенсивность дыхания намного выше, чем у животных клеток, он измеряется секундами. Наряду с этим обращает на себя внимание крайне низкая оборачиваемость α-фосфатной группы АТР, присое-

диненной непосредственно к D-рибозной части молекулы.

Несмотря на очень высокую оборачиваемость концевой фосфатной группы АТР в живых клетках, общая концентрация АТР остается все же постоянной. Это свидетельствует о стационарно-динамическом режиме функционирования системы АТР. Другими словами, скорость использования АТР в качестве источника энергии в точности уравновешивается скоростью процесса рефосфорилирования ADP до АТР, сопряженного с окислением клеточного топлива, т.е. с процессом, поставляющим энергию. Синтез АТР, сопряженный с окислением клеточного топлива, регулируется, и поэтому скорость образования АТР из ADP и фосфата всегда оказывается достаточной для того, чтобы энергетические нужды клетки в любой данный момент могли быть удовлетворены.

Краткое содержание главы

Химические реакции протекают в таком направлении, чтобы при равновесии суммарная энтропия S системы и окружающей среды была максимальной, а свободная энергия G реагирующих молекул – минимальной. Каждая химическая реакция характеризуется определенным изменением стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$; в качестве стандартных условий приняты: температура 25°С, давление 1 атм, концентрации всех исходных веществ и продуктов 1 М и pH 7,0. $\Delta G^{0\prime}$ можно рассчитать по уравнению $\Delta G^{0\prime} = -2{,}30\ RT \lg K'_{eq}$, если известна константа равновесия данной реакции K'_{eq}. Величина $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза АТР до ADP и фосфата равна $-7{,}3$ ккал/моль. У некоторых фосфорилированных соединений, например у 3-фосфоглицероилфосфата и фосфоенолпирувата (двух промежуточных продуктов на пути расщепления глюкозы до лактата), $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза выражается гораздо более отрицательной величиной, чем у АТР; их можно рассматривать поэтому как сверхвысокоэнергетические соединения. Для некоторых других фосфорилированных соединений, например для глюкозо-6-фосфата, характерны меньшие по абсолютной величине значения $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза по сравнению с АТР; их называют низкоэнергетическими соединениями. Под действием специфичных киназ фосфатные группы от сверхвысокоэнергетических фосфатов, образующихся в процессе катаболизма, могут переноситься на ADP, в результате чего синтезируется АТР. Другие специфичные киназы катализируют перенос концевой фосфатной группы АТР на молекулы-акцепторы, которые превращаются при этом в фосфорилированные (низкоэнергетические) соединения и оказываются благодаря этому активированными; в таком виде они могут вступать в реакции биосинтеза. Следовательно, АТР в процессе метаболизма играет роль универсального промежуточного продукта – переносчика фосфатных групп. АТР также поставляет энергию для функционирования сократительных актиновых и миозиновых нитей скелетных мышц. За счет этой энергии осуществляется скольжение нитей друг относительно друга и как результат этого – сокращение мышцы; при этом АТР гидролизуется до ADP и фосфата. Креатинфосфат служит резервуаром высокоэнергетических фосфатных групп в мышечных и нервных клетках. Под действием креатинкиназы он может передавать свои фосфатные группы молекулам ADP. Химическую энергию для мембранных АТРаз тоже поставляет АТР; это дает им возможность переносить ионы H^+ и некоторые другие катионы через мембраны против градиента концентрации.

Используемый в биосинтетических реакциях АТР может отдавать либо ортофосфатную, либо пирофосфатную группу; в первом случае образуется ADP, во втором – АМР. Продукт, образующийся при пирофосфатном расщеплении, АМР, вновь фосфорилируется до ADP в реакции, катализируемой аденилаткиназой: АТР + АМР $\rightleftharpoons$ 2ADP. Переносчиками высокоэнергетических фосфатных групп, направляемых в различные биосинтетические реакции, служат также и другие нуклеозид-5'-трифосфаты: GTP, UTP, СТР, dATP, dTTP и т.д.; эти же

трифосфаты играют роль предшественников в биосинтезе нуклеиновых кислот. В интактных дышащих клетках концевая фосфатная группа ATP непрерывно и очень быстро замещается за счет пула неорганического фосфата; в них поддерживается стационарно-динамическое состояние, при котором расход ATP, связанный с отщеплением его концевой фосфатной группы, в точности уравновешивается ресинтезом ATP из ADP и фосфата.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Atkinson D.E. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation, Academic Press, New York, 1977. Ценная книга, в которой подчеркивается важность энергетического заряда клетки для регуляции клеточного метаболизма.

Becker W.M. Energy and the Living Cell, Harper and Row, New York, 1977. В книге поставлено много проблем и предложены способы их решения.

Blum H.F. Time's Arrow and Evolution, 3d ed., Princeton University Press, Princeton, N.J., 1968. Очерки и размышления по вопросу об энтропии в биологии.

Broda E. The Evolution of Bioenergetic Processes, Pergamon, Oxford, 1975. (Имеется перевод: Брода Э. Эволюция биоэнергетических процессов.– М.: Мир, 1978.) Сравнительные и эволюционные аспекты биоэнергетики.

Krebs H.A., Kornberg H.L. Energy Transformations in Living Matter, Springer, New York, 1967. Классический анализ энергетики гликолиза и дыхания.

Lehninger A.L. Bioenergetics, 2d ed., Benjamin, Menlo Park, Calif., 1971. Вводный курс, освещающий различные аспекты биоэнергетики.

Lipmann F. Wanderings of a Biochemist, Wiley, New York, 1971. Новое издание классических статей одного из первых исследователей в области биоэнергетики, а также его воспоминания.

Miller G.T., Jr. Energetics, Kinetics and Life, Academic, New York, 1970. Биоэнергетика и экология.

Wood W.B., Wilson J.H., Benbow R.M., Hood L.E. Biochemistry: A Problems Approach., 2d ed., Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif., 1981.

Отдельные статьи

Erecinska M., Wilson D.F. Homeostatic Regulation of Cellular Energy Metabolism, Trends Biochem. Sci., **3**, 221–223 (1978).

Gates D.M. The Flow of Energy in the Biosphere, Sci. Am., **224**, 88–100, September 1971.

Ingraham L.L., Pardee A.B. Free Energy and Entropy in Metabolism, pp. 1–46. In: D.M. Greenberg (ed.), Metabolic Pathways, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1967.

Satir P. How Cilia Move, Sci. Am., **231**, 44–52, October 1974.

Tribus M., McIrvine K.C. Energy and Information, Sci. Am., **225**, 179–188, September 1971.

Вопросы и задачи

1. *Вычисление величины $\Delta G^{0\prime}$ по константе равновесия.* Вычислите изменение стандартной свободной энергии следующих метаболически важных ферментативных реакций при 25°C, исходя из приведенных значений констант равновесия (pH 7,0):

а) Глутамат + Оксалоацетат $\xrightleftharpoons{\text{Аспартатаминотрансфераза}}$ Аспартат + α-Кетоглутарат $K'_{eq} = 6{,}8$.

б) Дигидроксиацетонфосфат $\xrightleftharpoons{\text{Триозофосфат-изомераза}}$ Глицеральдегид-3-фосфат $K'_{eq} = 0{,}0475$.

в) Фруктозо-6-фосфат + ATP $\xrightleftharpoons{\text{Фосфофруктокиназа}}$ Фруктозо-1,6-дифосфат + ADP $K'_{eq} = 254$.

2. *Вычисление константы равновесия по величине $\Delta G^{0\prime}$.* Вычислите константы равновесия следующих реакций при pH 7,0 и температуре 25°C используя данные, приведенные в табл. 14-3:

а) Глюкозо-6-фосфат + H_2O $\xrightarrow{\text{Глюкозо-6-фосфатаза}}$ Глюкоза + Фосфат.

б) Лактоза + H_2O $\xrightarrow{\beta\text{-Галактозидаза}}$ Глюкоза + Галактоза.

в) Малат $\xrightarrow{\text{Фумараза}}$ Фумарат + H_2O.

3. *Величина $\Delta G^{0\prime}$ для сопряженных реакций.* Глюкозо-1-фосфат превращается во фруктозо-6-фосфат в двух последовательных реакциях:

Глюкозо-1-фосфат → Глюкозо-6-фосфат,

Глюкозо-6-фосфат → Фруктозо-6-фосфат.

Используя значения $\Delta G^{0\prime}$, приведенные в табл. 14-3, вычислите константу равновесия K'_{eq} для суммарной реакции при 25°C

Глюкозо-1-фосфат → Фруктозо-6-фосфат.

4. *Стратегия преодоления неблагоприятных этапов: АТР-зависимое химическое сопряжение.* Первым этапом катаболизма глюкозы является фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. Прямое фосфорилирование глюкозы неорганическим фосфатом описывается уравнением

Глюкоза + Фосфат →
→ Глюкозо-6-фосфат + H_2O
$\Delta G^{0\prime} = +3{,}3$ ккал/моль.

а) Вычислите константу равновесия приведенной выше реакции. В клетке печени крысы физиологические концентрации глюкозы и фосфата поддерживаются на уровне около 4,8 мМ. Какой будет равновесная концентрация глюкозо-6-фосфата при прямом фосфорилировании глюкозы неорганическим фосфатом? Можно ли считать приемлемым такой метаболический путь для катаболизма глюкозы? Выскажите свои соображения.

б) Теоретически можно увеличить концентрацию глюкозо-6-фосфата, сдвинув равновесие реакции вправо за счет повышения внутриклеточных концентраций глюкозы и фосфата. Примем, что концентрация фосфата неизменна и равна 4,8 мМ. Насколько потребуется при этом повысить внутриклеточную концентрацию глюкозы для того, чтобы равновесная концентрация глюкозо-6-фосфата составила 250 мкМ (именно такова его нормальная физиологическая концентрация)? Можно ли считать этот путь приемлемым с физиологической точки зрения, если учесть, что максимальная растворимость глюкозы меньше 1 М?

в) В этой главе мы говорили о том, что фосфорилирование глюкозы сопряжено в клетке с гидролизом АТР; таким образом, часть свободной энергии гидролиза АТР используется для осуществления неблагоприятного в энергетическом отношении фосфорилирования глюкозы.

Глюкоза + Фосфат →
→ Глюкозо-6-фосфат + H_2O
$\Delta G^{0\prime} = +3{,}3$ ккал/моль

АТР + H_2O → ADP + Фосфат
$\Delta G^{0\prime} = -7{,}3$ ккал/моль

Суммарная реакция: Глюкоза + + АТР → Глюкозо-6-фосфат + + ADP

Вычислите значения $\Delta G^{0\prime}$ и K'_{eq} для суммарной реакции. При таком АТР-зависимом фосфорилировании глюкозы, какой должна быть концентрация глюкозы для того, чтобы внутриклеточная концентрация глюкозо-6-фосфата составила 250 мкМ, если концентрации АТР и ADP равны соответственно 3,38 и 1,32 мМ? Можно ли считать такой сопряженный процесс хотя бы теоретически приемлемым путем для фосфорилирования глюкозы в клетке? Почему?

г) С термодинамической точки зрения сопряжение гидролиза АТР с фосфорилированием глюкозы не является невозможным, но мы не знаем, как оно происходит в действительности. Поскольку для сопряжения необходим какой-то общий промежуточный продукт, одна из возможностей заключается в том, что за счет гидролиза АТР увеличивается внутриклеточная концентрация неорганического фосфата, и это облегчает протекание неблагоприятной с термодинамической точки зрения реакции фосфорилирования глюкозы неорганическим фосфатом. Представляется ли вам этот путь подходящим? Аргументируйте свой ответ.

д) В клетках печени АТР-сопряженное фосфорилирование глюкозы катализируется ферментом глюкокиназой. Этот фермент связывает АТР и глюкозу, в результате чего образуется комплекс глюкоза–АТР–фермент и фосфат переносится непосредственно от АТР к глюкозе. В чем заключаются преимущества такого пути?

5. *Вычисление величин $\Delta G^{0\prime}$ для АТР-сопряженных реакций.* Исходя из данных табл. 14-5, вычислите значения $\Delta G^{0\prime}$ для реакций:

а) Креатинфосфат + ADP →
→ Креатин + ATP;

б) ATP + Фруктоза →
→ ADP + Фруктозо-6-фосфат.

6. *Вычисление $\Delta G'$ при физиологических условиях.* Вычислите изменение свободной энергии $\Delta G'$ (не $\Delta G^{0\prime}$) при физиологических условиях для реакции

Креатинфосфат + ADP →
→ Креатин + ATP,

протекающей в цитозоле клеток мозга при 25°C и следующих концентрациях компонентов: креатинфосфат – 4,7 мМ, креатин – 1,0, ADP – 0,20 и ATP – 2,6 мМ.

7. *Потребность в свободной энергии при синтезе ATP в физиологических условиях.* В цитозоле печени крысы отношение действующих масс равно

$$Q = \frac{[\mathrm{ATP}]}{[\mathrm{ADP}][\mathrm{P}_i]} = 5{,}33 \cdot 10^2.$$

Вычислите количество свободной энергии, необходимое для синтеза ATP в печени крысы.

8. *Суточная утилизация ATP в организме взрослого человека.*

а) Количество свободной энергии, необходимое для синтеза ATP из ADP и неорганического фосфата (P_i) при концентрациях исходных веществ и продуктов 1 М (стандартное состояние), составляет 7,3 ккал/моль. Поскольку истинные физиологические концентрации ADP, P_i и ATP в клетках отличаются от 1 М, количество свободной энергии, необходимой для синтеза ATP при физиологических условиях, отличается от $\Delta G^{0\prime}$. Вычислите количество свободной энергии, необходимое для синтеза ATP в клетке печени человека при физиологических концентрациях ATP, ADP и P_i, равных соответственно 3,5, 1,50 и 5,0 мМ.

б) Здоровый взрослый человек, вес которого составляет около 70 кг, должен ежедневно получать с пищей 2000 ккал. Пищевые вещества расщепляются в процессе метаболизма и высвобождающаяся при этом свободная энергия используется для синтеза ATP, который затем расходуется на выполнение ежедневной работы организма, химической и механической. Вычислите (в весовых единицах) количество ATP, утилизируемого за сутки организмом взрослого человека, если принять, что эффективность превращения заключенной в пище энергии в энергию ATP равна 50%. Какой процент от веса тела составляет это количество ATP?

в) Хотя ежедневно в организме взрослого человека образуются значительные количества ATP, вес тела, его строение и состав за этот период существенно не меняются. Как можно объяснить это?

9. *Запас ATP в мышечной ткани.* Концентрация ATP в мышечной ткани (в которой около 70% приходится на долю воды) равна приблизительно 8,0 мМ. В периоды усиленной мышечной активности ATP расходуется для мышечного сокращения со скоростью 300 мкмоль/мин на 1 г мышечной ткани.

а) На сколько времени хватает этого запаса ATP спринтеру, бегущему 100-метровую дистанцию?

б) Концентрация креатинфосфата в мышечной ткани составляет примерно 40,0 мМ. На какое время позволит креатинфосфат растянуть запас мышечного ATP?

в) Что делает возможным марафонский бег при таком запасе ATP?

10. *Расщепление ATP в процессе метаболизма до AMP и PP_i.* Образование активированной формы ацетата (ацетил-CoA) представляет собой ATP-зависимый процесс

Ацетат + CoA + ATP →
→ Ацетил-CoA + AMP + PP_i.

а) Величины $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза ацетил-CoA до ацетата и CoA и ATP до AMP и PP_i равны соответственно –7,5 и –7,3 ккал. Вычислите величину $\Delta G^{0\prime}$ для ATP-зависимого синтеза ацетил-CoA.

б) Почти во всех клетках присутствует фермент (неорганическая пирофосфатаза), катализирующий гидролиз PP_i до неорганического фосфата (P_i). Как влияет присутствие этого фермента на синтез ацетил-CoA? Дайте полный ответ.

ГЛАВА 15

ГЛИКОЛИЗ – ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ

Теперь, когда мы познакомились с принципами, лежащими в основе организации клеточного обмена и биоэнергетики, мы можем уяснить себе, каким образом химическая энергия, заключенная в структуре молекулы глюкозы, высвобождается в полезной форме, пригодной для выполнения разнообразной биологической работы клетки. Напомним, что глюкоза служит основным «топливом» у большинства организмов, что она богата энергией и что ее запасы, хранящиеся в виде гликогена, легко могут быть мобилизованы, как только у организма возникнет внезапная потребность в энергии.

Эту главу мы посвятим рассмотрению *гликолиза* – процесса, в ходе которого молекула глюкозы, построенная из шести углеродных атомов, расщепляется ферментативным путем, в десяти последовательных реакциях до двух молекул пирувата, содержащих по три углеродных атома. На протяжении этой последовательности реакций значительная часть энергии, высвободившейся из глюкозы, запасается в форме АТР. Гликолиз (от греч. glykýs – сладкий и lýsis – распад, разложение) изучен лучше других центральных метаболических путей, и потому мы рассмотрим его здесь достаточно подробно; в основе функционирования и регуляции этого процесса лежат некие общие принципы, характерные для всех метаболических путей. Мы обсудим здесь также пути, питающие гликолиз, т.е. пути, ведущие к нему от гликогена, дисахаридов и моносахаридов.

15.1. Гликолиз является одним из центральных метаболических путей у большинства организмов

Гликолиз почти универсален как один из центральных путей катаболизма глюкозы: он выполняет эту роль не только в животных и растительных клетках, но также и у многих микроорганизмов. Последовательности гликолитических реакций различаются у разных организмов только характером регуляции их скорости, а также метаболической судьбой образующегося пирувата.

Продукт гликолиза – пируват – может использоваться тремя способами. У аэробных организмов гликолиз составляет лишь первую стадию полного аэробного расщепления глюкозы до CO_2 и воды (рис. 15-1). Образовавшийся при гликолизе пируват претерпевает затем окислительное декарбоксилирование, т.е. теряет CO_2, а оставшийся двухуглеродный фрагмент в виде ацетильной группы включается в *ацетилкофермент А* (см. рис. 10-8). Далее уже эта ацетильная группа полностью окисляется до CO_2 и H_2O в *цикле лимонной кислоты* с участием молекулярного кислорода (рис. 15-1). Таков путь, на который вступает пируват в аэробных животных и растительных клетках.

Второй путь заключается в восстановлении пирувата до лактата. Когда некоторые животные ткани вынуждены функционировать в условиях анаэробиоза, а это особенно характерно, например, для напряженно работающей скелетной

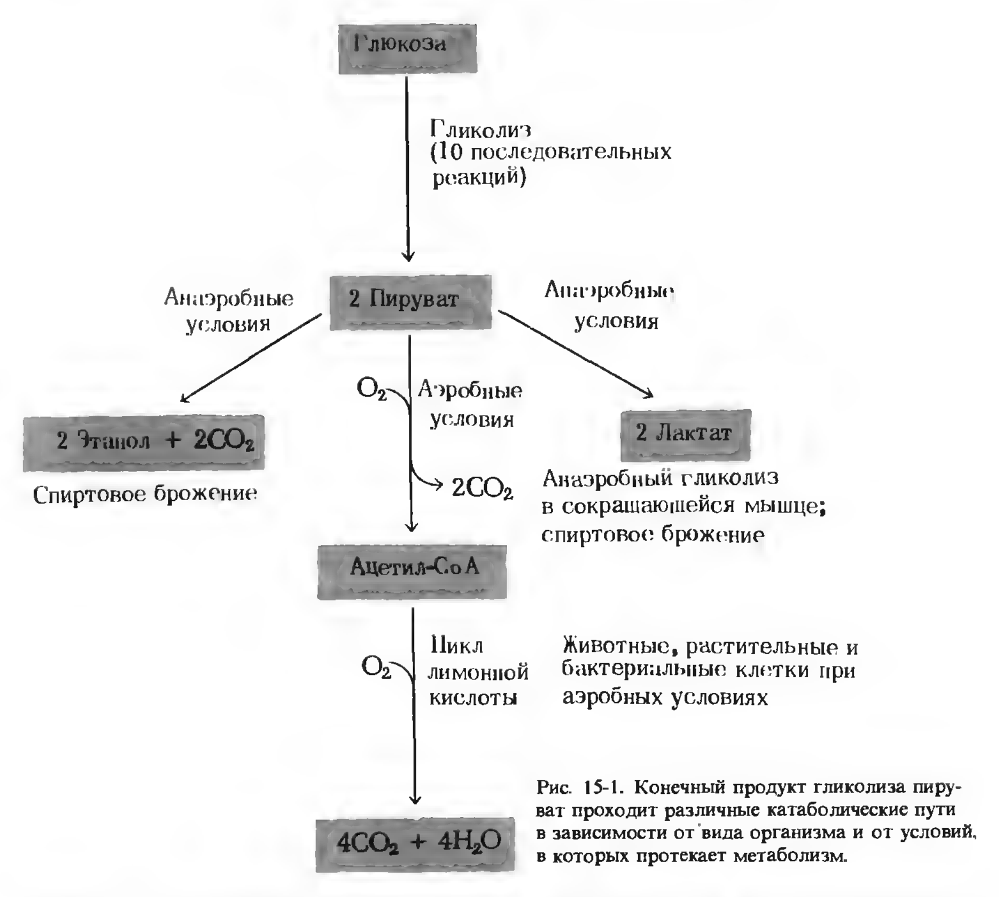


Рис. 15-1. Конечный продукт гликолиза пируват проходит различные катаболические пути в зависимости от вида организма и от условий, в которых протекает метаболизм.

мышцы образовавшийся из глюкозы пируват не может быть подвергнут дальнейшему окислению просто из-за отсутствия кислорода. В этих условиях продукт гликолиза пируват восстанавливается с образованием *лактата*. В скелетной мышце этот процесс, называемый *анаэробным гликолизом*, служит важным источником энергии АТР при напряженной физической работе. У анаэробных микроорганизмов, осуществляющих молочнокислое брожение, продуктом гликолиза является также лактат (рис. 15-1). Молочная кислота, образующаяся из сахара в результате деятельности молочнокислых бактерий, вызывает скисание молока, и эта же кислота придает квашеной капусте ее характерный чуть кислый вкус.

Третий путь превращений пирувата заканчивается образованием этанола. Существуют микроорганизмы (к ним относятся, например, пивные дрожжи), превращающие пируват, образовавшийся из глюкозы в процессе гликолиза, в этанол и CO_2. Этот процесс носит название *спиртового брожения* (рис. 15-1). *Брожение* — общий термин, которым обозначают анаэробное расщепление глюкозы или каких-нибудь других органических пищевых веществ для получения из них энергии в форме АТР. При разных типах брожения образуются разные продукты, характерные для организмов, осуществляющих данный тип брожения. Поскольку первые живые организмы появились на Земле в то время, когда ее атмосфера еще не содержала кислорода, анаэробное расщепление глюкозы следует считать наиболее древним из биологических механизмов, предназначенных для извлечения энергии из органических пищевых веществ.

15.2. С гликолизом сопряжен синтез ATP

В ходе гликолиза значительная часть свободной энергии, содержащейся в молекуле глюкозы, запасается в форме ATP. Это легко показать, написав уравнение химического баланса для анаэробного гликолиза, протекающего в напряженно работающей скелетной мышце:

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ + 2ATP +$$
$$+ 2H_2O.$$

Как видно из этого уравнения, на каждую расщепленную молекулу глюкозы из ADP и P_i образуются две молекулы ATP. Мы можем вычленить в анаэробном гликолизе два процесса и написать соответственно два уравнения: 1) для превращения глюкозы в лактат с высвобождением свободной энергии:

$$\text{Глюкоза} \rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ \quad (1)$$
$$\Delta G_1^{0\prime} = -47{,}0 \text{ ккал/моль}$$

и 2) для образования ATP из ADP и фосфата, которое требует затраты энергии:

$$2P_i + 2ADP \rightarrow 2ATP + 2H_2O \quad (2)$$
$$\Delta G_2^{0\prime} = +2 \cdot 7{,}30 = +14{,}6 \text{ ккал/моль.}$$

Эти два процесса не могут идти независимо друг от друга; они обязательно должны быть сопряжены. Однако, написав оба уравнения по отдельности, мы видим, что превращение 1 моль глюкозы в лактат в стандартных условиях приводит к высвобождению гораздо большего количества свободной энергии (47,0 ккал), чем необходимо для образования 2 моль ATP из ADP и фосфата ($2 \cdot 7{,}3 = +14{,}6$ ккал). В живой клетке при истинных внутриклеточных концентрациях ATP, ADP и P_i, а также глюкозы и лактата эффективность запасания высвобождающейся при гликолизе энергии в форме ATP превышает 60%.

Пользуясь уравнениями (1) и (2), мы можем определить также общее изменение стандартной свободной энергии при гликолизе, учитывающее и образование ATP. Это изменение $\Delta G_s^{0\prime}$ равно алгебраической сумме величин $\Delta G_1^{0\prime}$ и $\Delta G_2^{0\prime}$:

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ + 2ATP + \quad (3)$$
$$+ 2H_2O$$

$$\Delta G_s^{0\prime} = \Delta G_1^{0\prime} + \Delta G_2^{0\prime} =$$
$$= -47{,}0 + 14{,}6 =$$
$$= -32{,}4 \text{ ккал/моль.}$$

Мы видим, таким образом, что суммарная сопряженная реакция гликолиза сопровождается очень большим снижением свободной энергии. Как в стандартных условиях, так и в живых клетках гликолиз представляет собой необратимый процесс, идущий практически до конца именно из-за этого большого снижения свободной энергии.

15.3. В продуктах гликолиза сохраняется еще много свободной энергии

При гликолизе высвобождается только небольшая часть всей энергии, заключенной в молекуле глюкозы. Общее изменение стандартной свободной энергии при полном окислении глюкозы до CO_2 и H_2O составляет -686 ккал/моль (табл. 14-3). Следовательно, выход свободной энергии при гликолитическом расщеплении глюкозы на две молекулы лактата ($\Delta G^{0\prime} = -47{,}0$ ккал/моль) равен всего лишь $(47/686) \cdot 100 = 6{,}9\%$ того количества энергии, которое может высвободиться при полном окислении глюкозы до CO_2 и H_2O. Бóльшая часть биологически доступной энергии, заключенной в молекуле глюкозы, сохраняется в продуктах гликолиза–двух молекулах лактата. Она может высвободиться только в том случае, если продукты гликолиза подвергнутся полному окислению до CO_2 и H_2O молекулярным кислородом, играющим роль акцептора электронов (об этом мы будем подробно говорить в следующей главе). И тем не менее этот

анаэробный гликолиз до стадии лактата никак нельзя считать малоэффективным процессом, в котором энергия расходуется неэкономно. Напротив, гликолиз – удивительный по своему совершенству процесс, поскольку он обеспечивает получение энергии из глюкозы без ее окисления. В организме животных лактат, образующийся в работающих мышцах и диффундирующий в кровь, может возвращаться в цикл; он поступает в печень и здесь в период восстановления после напряженной мышечной работы вновь превращается в глюкозу. У некоторых видов животных анаэробный гликолиз играет чрезвычайно важную роль в мышечной активности (дополнение 15-1).

Дополнение 15-1. Анаэробный гликолиз, кислородная задолженность, аллигаторы и обитатели больших глубин

Большинство позвоночных - это по преимуществу аэробные организмы; глюкоза у них сначала правращается в процессе гликолиза в пируват, а затем этот пируват претерпевает полное окисление до CO_2 и H_2O под действием молекулярного кислорода. У большинства позвоночных, и в частности у человека, *анаэробный гликолиз* включается только на короткое время при напряженной работе мышц, например при беге на 100 м, т. е. в такие моменты, когда кислород не успевает достаточно быстро поступать в ткани и не успевает обеспечивать окисление пирувата и сопряженный с ним синтез АТР. Мышцы при этом используют в качестве «топлива» имеющийся в них запас гликогена и генерируют АТР посредством анаэробного гликолиза, конечным продуктом которого является лактат. Поэтому при беге на короткие дистанции в крови в весьма значительных количествах накапливается лактат. Позднее, в период восстановления, этот лактат медленно превращается в печени обратно в глюкозу; на протяжении периода восстановления потребление кислорода постепенно снижается до тех пор, пока не установится, наконец, нормальная интенсивность дыхания. Избыточное количество кислорода, потребленное за период восстановления, служит мерой *кислородной задолженности*. Это количество кислорода требуется для синтеза (в процессе дыхания) соответствующего количества АТР, которого должно хватить на то, чтобы пополнить израсходованный запас гликогена в печени и в мышцах, т. е. «ликвидировать задолженность», возникшую вследствие усиленной работы мышц во время бега.

Анаэробный гликолиз как один из источников энергии для мышечного сокращения играет особо важную роль в белых мышцах. Большинство скелетных мышц содержит как белые, так и красные волокна, однако есть и такие мышцы, которые состоят почти целиком из одних только красных или одних только белых волокон. У индеек мышцы крыла белые и летать они могут лишь на очень короткие расстояния. У лошади, способной к длительному непрерывному бегу, мышцы ног состоят преимущественно из красных волокон. Белые мышечные волокна, содержащие мало митохондрий, отличаются чрезвычайно высокой частотой сокращений. Источником АТР служит для них анаэробный гликолиз, так что работать с максимальной интенсивностью они могут лишь очень короткое время, поскольку имеющийся в них запас гликогена используется малоэффективно. В отличие от белых красные мышцы сокращаются медленнее, содержат много митохон-

дрий и получают энергию главным образом за счет окисления клеточного «топлива» кислородом; поэтому они могут работать непрерывно в течение длительного времени.

Вообще говоря, у мелких животных кислород доставляется к мышцам циркуляторными системами достаточно быстро, так что необходимости в анаэробном использовании мышечного гликогена у них нет. Птицы, например, при своих перелетах часто покрывают огромные расстояния с очень большой скоростью без какой бы то ни было кислородной задолженности. Красным мышцам многих бегающих животных среднего размера также свойствен по преимуществу аэробный метаболизм. Однако у крупных животных при напряженной и длительной работе циркуляторная система оказывается уже не в состоянии поддерживать полностью аэробный метаболизм в мышцах. Эти животные движутся обычно медленно, и только крайние обстоятельства вынуждают их к усиленной мышечной активности, поскольку за каждой такой вспышкой активности должен следовать долгий период восстановления, необходимый для погашения кислородной задолженности.

Медлительны и вялы, например, большую часть времени аллигаторы и другие крокодилы, однако эти рептилии способны к молниеносной атаке и столь же быстрому нанесению опасных ударов мощным хвостом. Такие бурные вспышки активности коротки; за ними неизменно следует долгий период восстановления сил. Для быстрых движений, когда в них возникает необходимость, ATP генерируется в белых скелетных мышцах этих животных путем анаэробного гликолиза. Поскольку запас гликогена в мышцах не очень велик, при напряженной работе мышц он быстро истощается. Кроме того, в мышцах и во внеклеточной жидкости при таких вспышках активности в очень большом количестве накапливается продукт анаэробного гликолиза лактат. В то время как тренированному спортсмену после бега на 100 м для восстановления нормального состояния достаточно каких-нибудь 30 мин, аллигатору после резкого броска может потребоваться многочасовой отдых с повышенным потреблением кислорода, для того чтобы из его крови был выведен избыток лактата, а в мышцах восстановился запас гликогена.

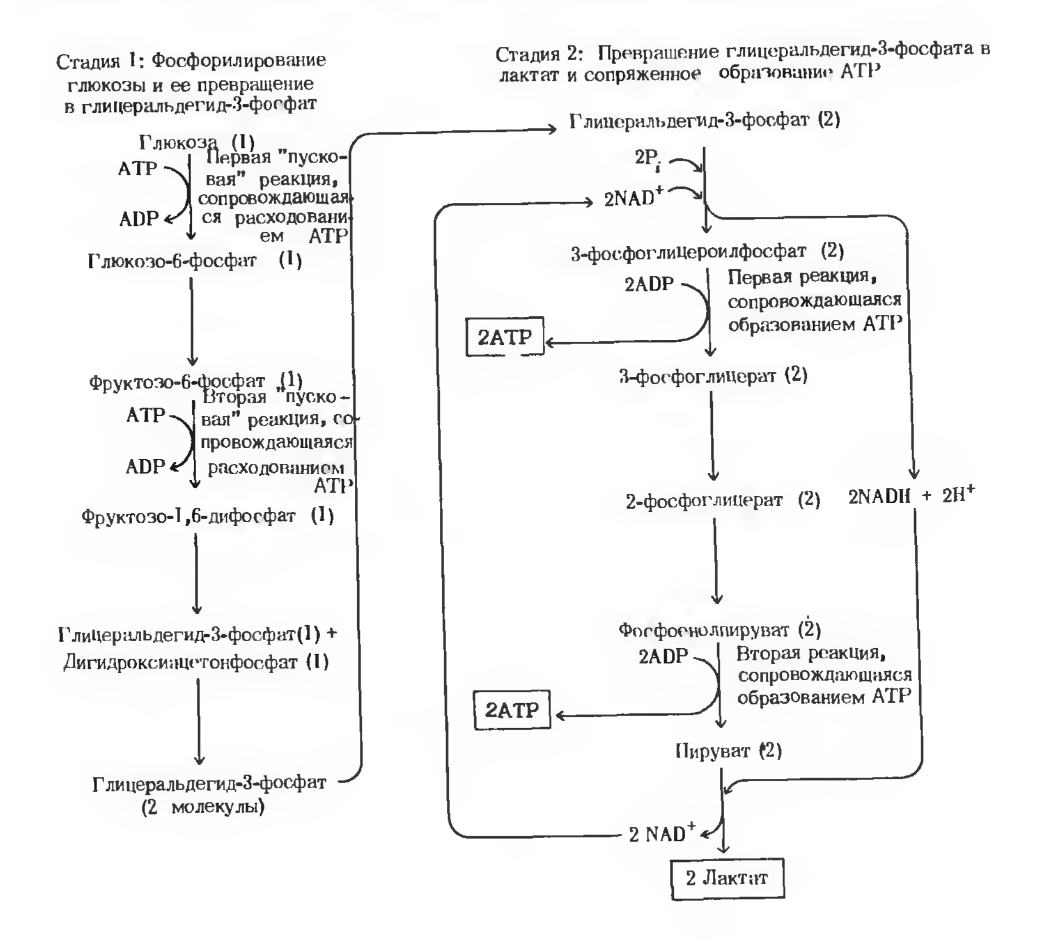
Аналогичные проблемы определяют характер метаболизма и у других крупных животных, таких, как слоны и носороги, а также у китов, тюленей и прочих морских млекопитающих, подолгу остающихся под водой. У динозавров и других гигантских доисторических животных источником энергии для работы мышц служил, вероятно, анаэробный гликолиз, и значит, им тоже были необходимы длительные периоды восстановления сил, во время которых эти животные легко становились добычей более мелких хищников, способных лучше использовать кислород, а потому и лучше приспособленных к длительной мышечной активности.

Глубоководные исследования показали, что на очень больших глубинах, там, где содержание кислорода в воде близко к нулю, обитает тем не менее много видов животных. У этих обитателей больших глубин метаболизм имеет по преимуществу анаэробный характер; расщепление углеводов приводит у них к образованию лактата и некоторых других продуктов, большая часть которых должна выводиться из организма. У некоторых морских позвоночных для получения энергии в форме ATP глюкоза сбраживается не до лактата, а до этанола и CO_2.

15.4. Гликолиз включает две стадии

Прежде чем заняться рассмотрением отдельных ферментативных этапов гликолиза, попробуем охарактеризовать этот процесс в более общем плане. Расщепление шестиуглеродной молекулы глюкозы на две трехуглеродные молекулы пирувата совершается при участии десяти ферментов. Все они были выделены в чистом виде из разных видов организмов и тщательно изучены. Первые пять этапов составляют *подготовительную стадию гликолиза* (рис. 15-2). В этих ферментативных реакциях глюкоза фосфорилируется за счет АТР сначала в положении 6, а затем в положении 1 с образованием *фруктозо-1,6-дифосфата*, который расщепляется на две молекулы трехуглеродного соединения – *глицеральдегид-3-фосфата*. Таким образом, продуктом первой стадии гликолиза является глицеральдегид-3-фосфат. Отметим, что на активацию молекулы глюкозы и подготовку ее к расщеплению на два трехуглеродных фрагмента должны быть затрачены две молекулы АТР; впоследствии этот «вклад» принесет весьма солидную прибыль. Далее, мы покажем, что и другие гексозы, в частности D-фруктоза, D-галактоза и D-манноза, тоже могут вовлекаться в подготовительную стадию гликолиза, после того как они подвергнутся фосфорилированию. Подготовительная стадия гликолиза служит, таким образом, для того, чтобы превратить углеродные цепочки

Рис. 15-2. Две стадии анаэробного гликолиза. Цифры в скобках означают число молекул, вступающих в данную реакцию.



всех метаболизируемых гексоз в один общий продукт – глицеральдегид-3-фосфат.

Вторая стадия гликолиза, также состоящая из пяти ферментативных реакций, представляет собой, образно говоря, выплату процентов; на этой стадии энергия, высвобождающаяся при превращении двух молекул глицеральдегид-3-фосфата в две молекулы пирувата, запасается (в результате сопряженного фосфорилирования четырех молекул ADP) в виде четырех молекул ATP (рис. 15-2). Общий выход ATP в процессе гликолиза равен, однако, не четырем, а только двум молекулам ATP в расчете на одну расщепленную молекулу глюкозы, поскольку две молекулы ATP были уже израсходованы на первой стадии гликолиза.

Гликолиз включает химические превращения трех разных типов: 1) распад углеродного скелета глюкозы с образованием пирувата (путь атомов углерода); 2) фосфорилирование ADP высокоэнергетическими фосфорилированными соединениями с образованием ATP (путь фосфатных групп) и 3) перенос водородных атомов или электронов (путь переноса электронов). Мы проследим все эти пути, когда перейдем к обсуждению отдельных реакций гликолиза.

Отметим еще одно обстоятельство. У подавляющей части клеток ферменты, катализирующие гликолитические реакции, присутствуют в растворимой форме в цитозоле, т. е. в гомогенной водной фазе цитоплазмы (разд. 2.18). В отличие от них ферменты, катализирующие те этапы окисления углеводов, которые требуют присутствия кислорода, локализуются в мембранах: в эукариотических клетках в митохондриальных мембранах, а в прокариотических – в плазматических мембранах.

15.5. В ходе гликолиза образуются фосфорилированные промежуточные продукты

Знакомясь с последовательностью гликолитических реакций, мы прежде всего должны подчеркнуть тот важный факт, что все девять промежуточных продуктов на пути от глюкозы до пирувата представляют собой фосфорилированные соединения (рис. 15-2). Фосфатные группы выполняют, по-видимому, три функции.

1. При pH 7 фосфатные группы полностью ионизованы, и потому они придают каждому из промежуточных продуктов гликолиза суммарный отрицательный заряд. Поскольку клеточные мембраны обычно непроницаемы для молекул, несущих электрический заряд, промежуточные продукты гликолиза не могут выйти из клетки. Глюкоза попадает внутрь клеток, а лактат или пируват покидают их только благодаря тому, что в клеточных мембранах имеются особые транспортные системы, способные переносить молекулы именно этих соединений.
2. Вторая функция фосфатных групп очевидна: они являются необходимыми компонентами в процессе ферментативного запасания метаболической энергии, поскольку они в конце концов передаются на ADP с образованием ATP.
3. Фосфатные группы выполняют функцию узнавания; это связывающие группы, благодаря которым молекулы промежуточных продуктов гликолиза занимают правильное положение относительно активных центров соответствующих ферментов.

Почти все гликолитические ферменты нуждаются для проявления активности в ионах Mg^{2+}. Известно, что ионы Mg^{2+} образуют комплексы с фосфатными группами промежуточных продуктов гликолиза, а также с фосфатными группами ADP и ATP (разд. 14.8). Отсюда напрашивается вывод, что субстратсвязывающие участки многих гликолитических ферментов проявляют специфичность не столько в отношении самих фосфорилированных промежуточных продуктов, сколько в отношении их комплексов с ионами Mg^{2+}.

15.6. Первая стадия гликолиза завершается расщеплением углеродного скелета глюкозы

На рис. 15-3 показаны отдельные ферментативные этапы первой стадии гликолиза и структурные формулы соответствующих соединений. Из этой схемы, дополняющей рис. 15-2, видно, каким образом шестиуглеродная цепь глюкозы расщепляется на две молекулы трехуглеродного соединения глицеральдегидфосфата.

а. Фосфорилирование глюкозы

На этом первом этапе молекула D-глюкозы активируется для участия в последующих реакциях путем фосфорилирования за счет ATP в положении 6 с образованием глюкозо-6-фосфата (рис. 15-3). Эта реакция, которая в условиях клетки протекает необратимо, катализируется ферментом *гексокиназой*

$$ATP^{4-} + \alpha\text{-D-глюкоза} \xrightarrow{Mg^{2+}} ADP^{3-} + \alpha\text{-D-глюкозо-6-фосфат}^{2-} + H^{+}$$

$$\Delta G^{0\prime} = -4{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

Гексокиназа присутствует почти во всех клетках – животных, растительных и бактериальных. Она катализирует фосфорилирование не только D-глюкозы, но и некоторых других обычных гексоз, например D-фруктозы и D-маннозы. Гексокиназу удалось выделить из дрожжевых клеток в кристаллическом виде, и ее трехмерная структура была детально изучена методом рентгеноструктурного анализа. Связывание гексокиназы с гексозой происходит по типу индуцированного соответствия: молекула фермента претерпевает при этом глубокое конформационное изменение (см. рис. 12 и 13 к дополнению 9-4). Для проявления активности гексокиназе необходимы ионы Mg^{2+}, поскольку истинным субстратом для этого фермента служит не ATP^{4-}, а комплекс $MgATP^{2-}$ (разд. 14.8).

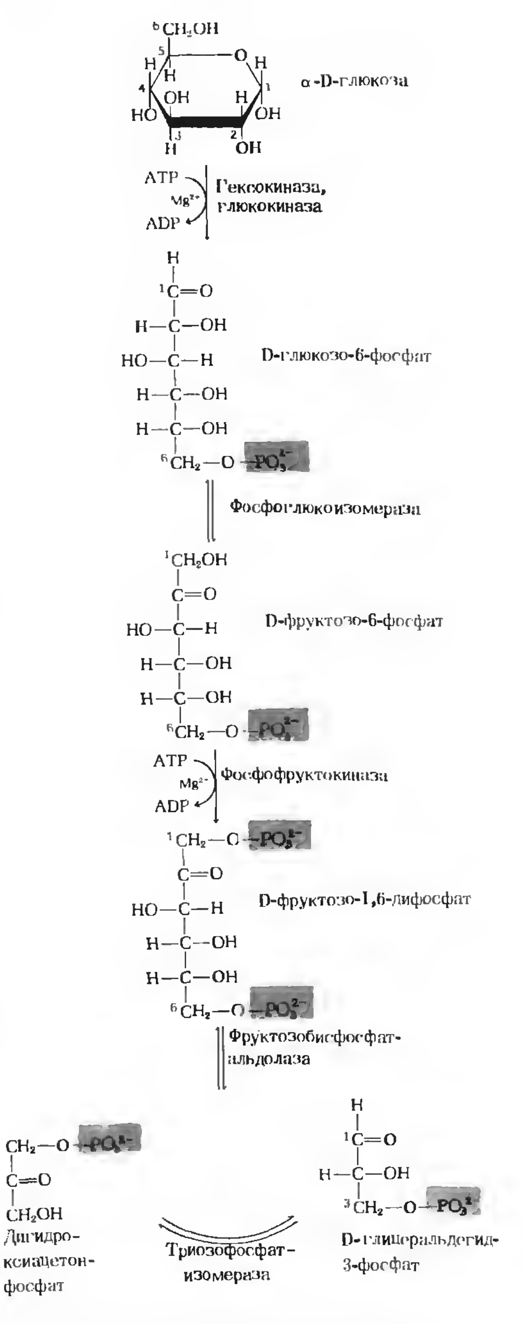


Рис. 15-3. Последовательность реакций, составляющих первую стадию гликолиза. Названия ферментов выделены красным. Цифры указывают положение атомов углерода. Глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат представлены здесь для простоты в виде структур с открытой цепью, хотя в действительности они существуют в клетке в виде α-аномерных форм с замкнутым кольцом.

У разных организмов и в разных тканях гексокиназа представлена различными изоформами (разд. 9.23). Хотя все эти изоформы катализируют одну и ту же реакцию (рис. 15-3), они различаются между собой по своим кинетическим свойствам. Гексокиназа мышечных клеток характеризуется, например, низкой величиной K_M для глюкозы (около 0,1 мМ), поэтому она фосфорилирует глюкозу крови (4–5 мМ) с максимальной скоростью. Мышечная гексокиназа резко ингибируется продуктом катализируемой ею реакции – глюкозо-6-фосфатом. Это обстоятельство наряду с некоторыми другими данными позволило сделать вывод, что гексокиназа выполняет в мышцах функцию регуляторного фермента. Глюкозо-6-фосфат является при этом одновременно и продуктом реакции, и аллостерическим ингибитором. Когда концентрация глюкозо-6-фосфата в клетке поднимается выше нормального уровня, он временно и обратимо ингибирует гексокиназу, так что скорость его образования приводится в соответствие со скоростью утилизации.

В печени присутствует другая форма фермента, получившая название глюкокиназы, которая не обнаружена в других тканях. Глюкокиназа отличается от изоферментов группы гексокиназы тремя особенностями: во-первых, она специфична только в отношении D-глюкозы и не действует на другие гексозы; во-вторых, глюкозо-6-фосфат не является для нее ингибитором и, наконец, в-третьих, она характеризуется гораздо более высокой по сравнению с гексокиназой величиной K_M для глюкозы (около 10 мМ). Глюкокиназа печени вступает в действие только тогда, когда концентрация глюкозы в крови заметно возрастает, как это бывает, например, после приема пищи, богатой углеводами. В этих условиях глюкокиназа действует на избыточную глюкозу крови и переводит ее в глюкозо-6-фосфат для отложения в запас в виде гликогена печени. У больных *сахарным диабетом* количество глюкокиназы снижено, и это имеет для организма очень серьезные последствия. При сахарном диабете поджелудочная железа не вырабатывает достаточного количества инсулина (гл. 25); уровень глюкозы в крови в связи с этим сильно повышен, а в печени из-за недостаточности глюкокиназы образуется мало гликогена.

б. Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат

Фермент *фосфоглюкоизомераза* (его удалось выделить в высокоочищенном виде из мышечной ткани) катализирует обратимую реакцию изомеризации (рис. 15-3), в результате которой глюкозо-6-фосфат (альдоза) превращается во фруктозо-6-фосфат (кетозу). Карбонильная группа перемещается при этом из положения 1 в положение 2:

$$\alpha\text{-D-глюкозо-6-фосфат} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \alpha\text{-D-фруктозо-6-фосфат}$$

$$\Delta G^{0\prime} = +0{,}4 \text{ ккал/моль.}$$

Поскольку эта реакция сопровождается относительно небольшим изменением стандартной свободной энергии, она легко протекает в обоих направлениях. Фосфоглюкоизомераза нуждается в ионах Mg^{2+} и обладает специфичностью в отношении глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата.

в. Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата

Это вторая из двух «пусковых» реакций гликолиза. *Фосфофруктокиназа* (рис. 15-3), которой для проявления активности требуются ионы Mg^{2+}, катализирует перенос фосфатной группы от ATP в положение 1 D-фруктозо-6-фосфата, в результате чего образуется *фруктозо-1,6-дифосфат*:

$$\text{ATP} + \text{D-фруктозо-6-фосфат} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{D-фруктозо-1,6-дифосфат} + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -3{,}40 \text{ ккал/моль.}$$

В условиях клетки эта реакция практически необратима.

Фосфофруктокиназная реакция – второй важный «контрольный пункт» гликолиза. Подобно гексокиназе, фосфофруктокиназа представляет собой регуляторный фермент (гл. 9); среди известных регуляторных ферментов это один из наиболее сложных. Фосфофруктокиназа – главный регуляторный фермент гликолиза в мышцах. Всякий раз, когда в клетке начинает иссякать запас ATP или же накапливается избыток продуктов его распада, т.е. ADP и AMP (особенно AMP), активность фосфофруктокиназы возрастает. И, напротив, фосфофруктокиназа ингибируется, когда в клетке оказывается достаточно ATP и другого клеточного «топлива», например цитрата или жирных кислот. О регуляторном действии фосфофруктокиназы мы еще будем говорить ниже.

г. Расщепление фруктозо-1,6-дифосфата

Эта реакция катализируется ферментом, который называется *фруктозодифосфатальдолазой* или просто *альдолазой*. Фермент легко может быть выделен в кристаллическом виде из экстрактов мышц кролика. Катализируемая альдолазой реакция представляет собой обратимую альдольную конденсацию (рис. 15-3). Фруктозо-1,6-дифосфат обратимо расщепляется с образованием двух триозофосфатов: *глицеральдегид-3-фосфата* (альдозы) и дигидроксиацетонфосфата (кетозы):

D-фруктозо-1,6-дифосфат ⇌

⇌ Дигидроксиацетонфосфат +

+ D-глицеральдегид-3-фосфат

$\Delta G^{0'} = +5{,}73$ ккал/моль.

Альдолаза животных тканей не требует ионов Mg^{2+}, но у многих микроорганизмов этот фермент содержит ионы Zn^{2+}. Хотя $\Delta G^{0'}$ альдолазной реакции выражается большой положительной величиной, при внутриклеточных значениях pH и концентрации эта реакция может легко идти как в том, так и в другом направлении. Продукты прямой реакции быстро удаляются (вовлекаются в дальнейшие превращения).

д. Взаимопревращения триозофосфатов

Из двух триозофосфатов, образующихся в альдолазной реакции, только один, а именно глицеральдегид-3-фосфат способен подвергаться расщеплению в последующих реакциях гликолиза. Однако дигидроксиацетонфосфат может легко и обратимо превращаться в глицеральдегид-3-фосфат под действием пятого фермента гликолитического пути триозофосфатизомеразы (рис. 15-3)

Дигидроксиацетонфосфат ⇌

⇌ D-глицеральдегид-3-фосфат

$\Delta G^{0'} = +1{,}83$ ккал/моль.

Отметим, что в результате этой реакции 1-й, 2-й и 3-й углеродные атомы исходной глюкозы становятся неотличимыми соответственно от 6-го, 5-го и 4-го атомов (рис. 15-4).

Этой реакцией завершается первая стадия гликолиза. Таким образом, на первой стадии гликолиза молекула гексозы фосфорилируется по положениям 1 и 6, а затем расщепляется с образованием в конечном счете двух молекул глицеральдегид-3-фосфата. Ниже мы увидим, что и другие гексозы, например D-фруктоза, D-манноза и D-галактоза, также могут превращаться в глицеральдегид-3-фосфат.

15.7. На второй стадии гликолиза запасается энергия

Вторая стадия гликолиза (см. последовательность реакций на рис. 15-5) включает реакции фосфорилирования, в ходе которых свободная энергия, содержавшаяся в исходной молекуле глюкозы, высвобождается и запасается в форме ATP. Поскольку из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, обе половины молекулы глюкозы на второй стадии гликолиза во-

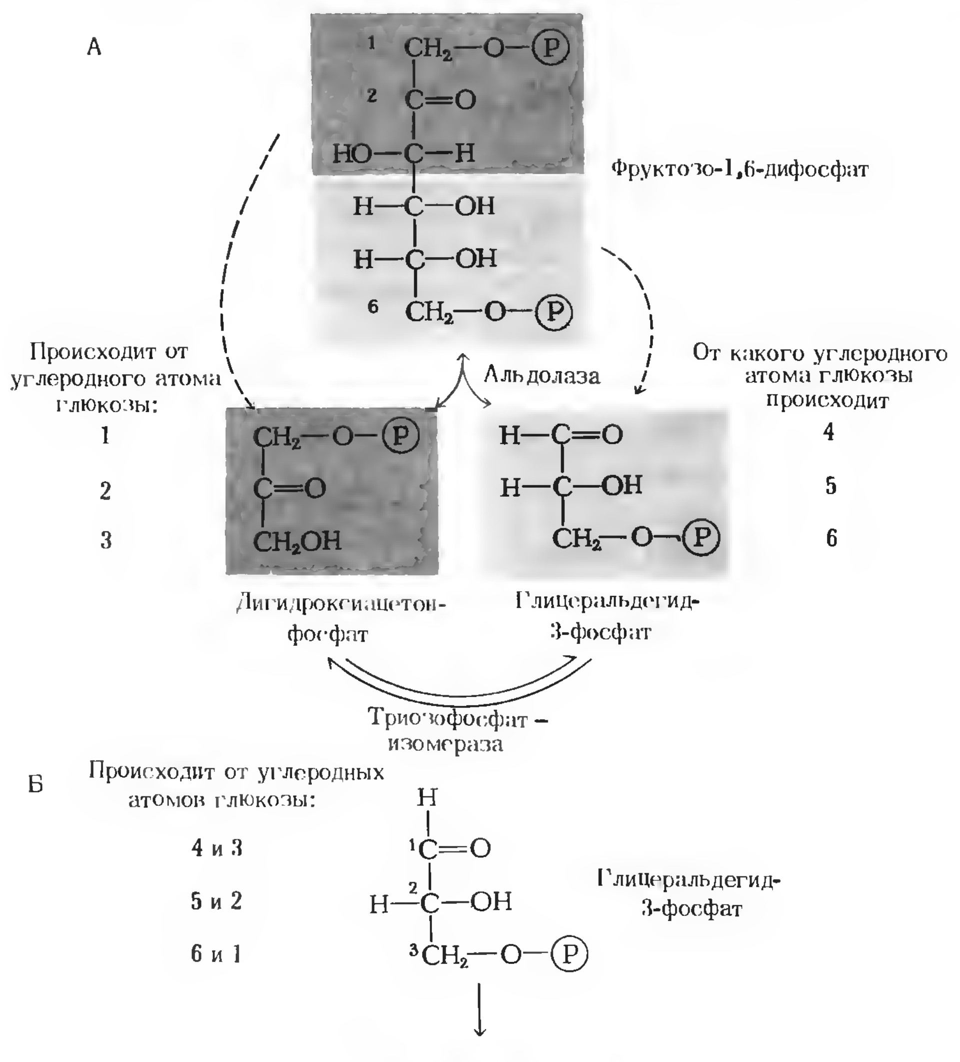


Рис. 15-4. Судьба атомов углерода глюкозы при образовании глицеральдегид-3-фосфата. *А*. Альдолазная и триозофосфатизомеразная реакции. *Б*. В результате триозофосфатизомеразной реакции две половины исходной молекулы глюкозы превращаются в две молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Каждый из трех атомов углерода глицеральдегид-3-фосфата ведет свое происхождение от одного из двух атомов глюкозы, как это показано на рисунке. Нумерация атомов углерода глицеральдегид-3-фосфата не совпадает с нумерацией атомов углерода D-глюкозы. Об этом следует помнить при интерпретации результатов экспериментов с D-глюкозой, в которых метку несет только один из ее атомов углерода.

влекаются в одни и те же реакции. Превращение двух молекул глицеральдегид-3-фосфата в две молекулы пирувата сопровождается образованием четырех молекул ATP из ADP. Однако суммарный выход ATP на одну расщепленную молекулу глюкозы равен всего лишь двум молекулам, поскольку на первой стадии гликолиза две молекулы ATP расходуются на фосфорилирование молекулы гексозы в положениях 1 и 6.

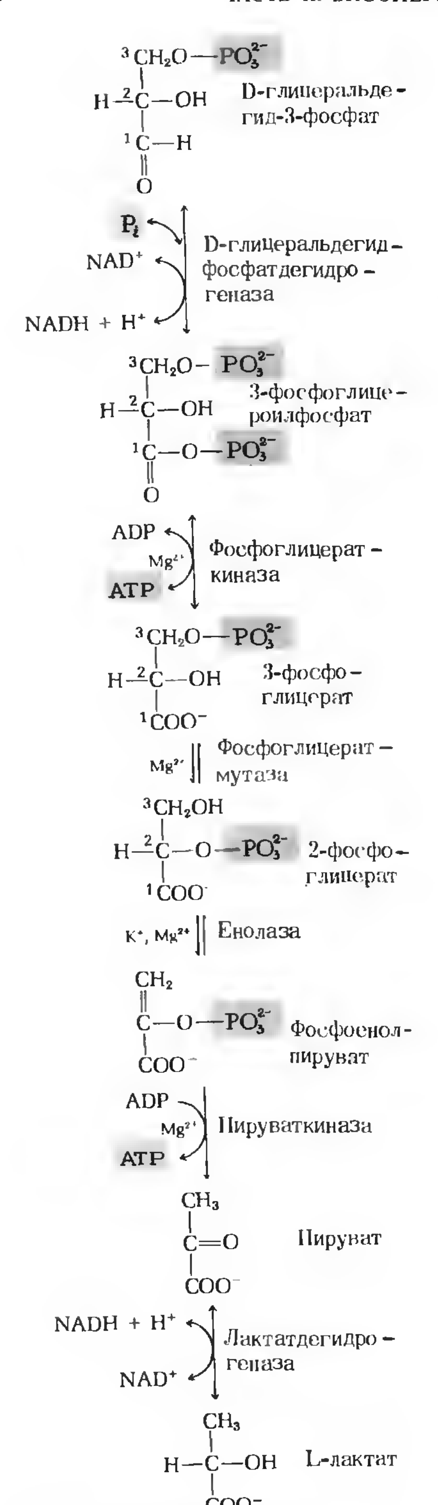


Рис. 15-5. Вторая стадия гликолиза.

а. Окисление глицеральдегид-3-фосфата до 3-фосфоглицероилфосфата

Это первая из двух реакций гликолиза, которые ведут к запасанию энергии в форме АТР (рис. 15-5). Фермент *глицеральдегидфосфатдегидрогеназа* катализирует обратимую реакцию

$$\text{D-глицеральдегид-3-фосфат} + NAD^+ + P_i \rightleftharpoons \text{3-фосфоглицероилфосфат} + NADH + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = +1{,}5 \text{ ккал/моль}.$$

В результате этой сложной реакции альдегидная группа D-глицеральдегид-3-фосфата окисляется, но при этом образуется не карбоновая кислота, как можно было бы ожидать, а смешанный ангидрид фосфорной и 3-фосфоглицериновой кислот – *3-фосфоглицероилфосфат.* Такого типа ангидрид, называемый *ацилфосфатом*, характеризуется очень высоким значением $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза (– 11,8 ккал/моль), т.е. относится к категории сверхвысокоэнергетических фосфорилированных соединений (разд. 14.9). Для второй фосфатной группы 3-фосфоглицероилфосфата, т.е. для фосфатной группы в положении 3, стандартная свободная энергия гидролиза составляет всего около 3,2 ккал/моль. Таким образом, значительная часть свободной энергии, высвобождающейся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата, сохраняется в высокоэнергетической фосфатной группе ацилфосфата (при С-1).

Роль акцептора водорода в глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции играет кофермент NAD^+ (рис. 15-6), представляющий собой окисленную форму *никотинамидадениндинуклеотида*, содержащего витамин никотинамид (разд. 10.6). При переходе NAD^+ в восстановленную форму (обозначается NADH; рис. 15-6) от альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата в положение 4 никотинамидного кольца NAD^+ переносится ферментативным путем гидрид-

Рис. 15-6. *А*. Структура никотинамидаденин-динуклеотида в окисленной форме (NAD^+). *Б*. Восстановление NAD^+ путем переноса гидрид-иона (: H^-) от субстрата RH_2 в положение 4 никотинамидного кольца. См. также рис. 10-7.

ион (:H^-), результатом чего оказывается восстановление в положениях 1 и 4. Второй водородный атом субстрата переходит при этом в среду в виде H^+-иона. Уравнение, описывающее ферментативное восстановление NAD^+, отражает это обстоятельство:

$$\text{Субстрат} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Окисленный субстрат} + NADH + H^+.$$

Механизм действия глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы довольно сложен (рис. 15.7). Сначала субстрат взаимодей-

Рис. 15-7. *А*. Схема, поясняющая механизм действия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Между субстратом и SH-группой в активном центре фермента возникает ковалентная связь – образуется тиополуацеталь. Этот промежуточный продукт, представляющий собой фермент-субстратный комплекс, окисляется за счет NAD^+, который также связан с активным центром фермента; в результате образуется тиоэфир - ковалентный промежуточный продукт, называемый ацилферментом. Связь между ацильной группой и тиоловой группой фермента характеризуется очень высокой стандартной свободной энергией гидролиза. На последнем этапе тиоэфирная связь претерпевает фосфоролиз, в результате чего происходит регенерация свободного фермента и образуется ацилфосфат, сохраняющий в себе значительную часть энергии, высвободившейся при окислении альдегидной группы. *Б*. Иодацетат является мощным ингибитором глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы, потому что он образует ковалентную связь с важной функциональной SH-группой фермента и таким образом инактивирует фермент.

ствует с SH-группой остатка цистеина, играющего важную роль в активном центре фермента. Затем фермент катализирует перенос гидрид-иона от ковалентно связанного субстрата на NAD^+, также прочно связанный с его активным центром. В ходе этого процесса возникает высокоэнергетический ковалентный ацилферментный комплекс. Этот комплекс взаимодействует с неорганическим фосфатом, в результате чего образуется свободный 3-фосфоглицероилфосфат и регенерирует свободный фермент. NADH, образовавшийся в этой реакции, затем снова переходит в окисленную форму (NAD^+), так что он может участвовать в расщеплении многих молекул глюкозы до пирувата. Если бы такого реокисления NADH не происходило, то гликолиз быстро прекращался бы из-за исчерпания запаса NAD^+, поскольку его количество в клетке невелико.

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа была выделена в кристаллическом виде из скелетных мышц кролика. Ее мол. масса равна 140000. Молекула фермента состоит из четырех идентичных субъединиц. Каждая такая субъединица представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую около 330 аминокислотных остатков. Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа ингибируется иодацетатом (разд. 9.12), который связывает важную функциональную SH-группу фермента и тем самым лишает его возможности осуществлять катализ (рис. 15-7, *Б*). Обнаружение того, что иодацетат подавляет гликолиз, сыграло важную роль в истории изучения ферментных систем (разд. 13.13).

б. Перенос фосфатной группы от 3-фосфоглицероилфосфата на ADP

Фермент *фосфоглицераткиназа* катализирует перенос высокоэнергетической фосфатной группы от карбоксильной группы 3-фосфоглицероилфосфата на ADP с образованием ATP и *3-фосфоглицерата*:

$$\text{3-фосфоглицероилфосфат} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{3-фосфоглицерат} + \text{ATP}$$

$$\Delta G^{0\prime} = -4{,}50 \text{ ккал/моль.}$$

Эта реакция гликолиза вместе с предшествующей реакцией обеспечивает сопряжение энергии. Если написать подряд уравнения этих двух реакций, то сразу видно, что 3-фосфоглицероилфосфат играет здесь роль общего промежуточного продукта. Он образуется в первой реакции, а во второй его высокоэнергетическая фосфатная группа переносится на ADP с образованием ATP:

$$\text{Глицеральдегид-3-фосфат} + P_i + NAD^+ \rightleftharpoons \text{3-фосфоглицероилфосфат} + NADH + H^+,$$

$$\text{3-фосфоглицероилфосфат} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{3-фосфоглицерат} + \text{ATP}.$$

Суммарное уравнение двух этих последовательных реакций, сопряженных друг с другом благодаря наличию общего промежуточного продукта (3-фосфоглицероилфосфата), имеет следующий вид:

$$\text{Глицеральдегид-3-фосфат} + P_i + \text{ADP} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{3-фосфоглицерат} + \text{ATP} + NADH + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -3{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

Конечный результат этих двух реакций, обратимых в условиях клетки, заключается в том, что энергия, высвободившаяся при окислении альдегидной группы до карбоксильной, оказывается запасенной благодаря сопряженному образованию ATP из ADP и фосфата. Такое образование ATP, сопряженное с ферментативным превращением одного из «субстратов», т. е. одного из промежуточных продуктов метаболизма, например глицеральдегид-3-фосфата, назы-

вают *фосфорилированием на уровне субстрата.* Ниже мы познакомимся и с другими примерами процессов этого типа.

в. Превращение 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат

Фермент фосфоглицератмутаза катализирует обратимую реакцию переноса фосфатной группы из одного положения в другое в пределах молекулы субстрата

$$\text{3-фосфоглицерат} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{2-фосфоглицерат}$$

$$\Delta G^{0'} = +1{,}06 \text{ ккал/моль.}$$

Для этой реакции, в ходе которой фосфатная группа переносится в молекуле глицерата из положения 3 в положение 2 (рис. 15-5), необходим Mg^{2+}. Название *мутаза* часто используют для обозначения ферментов, катализирующих внутримолекулярные перемещения функциональных групп.

г. Дегидратация 2-фосфоглицерата с образованием фосфоенолпирувата

Это вторая реакция гликолиза, в результате которой образуется высокоэнергетическое фосфорилированное соединение; фермент *енолаза* катализирует обратимую реакцию отщепления воды от 2-фосфоглицерата с образованием *фосфоенолпирувата* (рис. 15-5):

$$\text{2-фосфоглицерат} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}$$

$$\overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{Фосфоенолпируват} + H_2O$$

$$\Delta G^{0'} = +0{,}44 \text{ ккал/моль.}$$

Несмотря на сравнительно небольшое изменение стандартной свободной энергии в ходе данной реакции, величины $\Delta G^{0'}$ гидролиза фосфатных групп исходного вещества и продукта различаются очень сильно. Для фосфоглицерата (низкоэнергетического фосфорилированного соединения) эта величина равна приблизительно −4,2 ккал, а для фосфоенолпирувата (сверхвысокоэнергетического фосфорилированного соединения) она составляет −14,8 ккал (разд. 14.9). Общее содержание энергии в 2-фосфоглицерате и фосфоенолпирувате почти одинаково, однако отщепление молекулы воды от 2-фосфоглицерата вызывает перераспределение энергии внутри молекулы. Этим перераспределением и объясняется тот факт, что гидролитическое отщепление фосфатной группы от молекулы фосфоенолпирувата сопровождается гораздо большим снижением свободной энергии.

Енолаза (мол. масса 85 000) была получена в кристаллическом виде из нескольких источников. Для проявления ее активности необходимы ионы Mg^{2+}, с которыми фермент образует комплекс, прежде чем присоединить субстрат. Для енолазы характерно ингибирование фторидом (F^-) в присутствии фосфата; истинным ингибитором являются при этом ионы фторфосфата, связывающие ионы Mg^{2+}.

д. Перенос фосфатной группы от фосфоенолпирувата на ADP

Последним этапом гликолиза является перенос высокоэнергетической фосфатной группы от фосфоенолпирувата на ADP (рис. 15-5). Эта реакция, катализируемая *пируваткиназой*, представляет собой еще один пример фосфорилирования на уровне субстрата. Продукт реакции пируват образуется в енольной форме:

$$\text{Фосфоенолпируват} + \text{ADP} \xrightarrow[K^+]{Mg^{2+}}$$

$$\xrightarrow[K^+]{Mg^{2+}} \text{Енолпируват} + \text{ATP},$$

однако эта енольная форма быстро переходит неферментативным путем в кетоформу, доминирующую при pH 7,0:

$$\underset{\text{Энолпируват}}{CH_2{=}C(OH){-}COO^-} \rightleftharpoons \underset{\text{Кетопируват}}{CH_3{-}C({=}O){-}COO^-}$$

Равновесие этой реакции очень сильно сдвинуто вправо, и это в соответствии с законом действующих масс «тянет» вправо также и предшествующую пируваткиназную реакцию. Суммарное уравнение для пируваткиназной реакции и для неферментативного образования кетопирувата имеет вид

$$\text{Фосфоенолпируват} + \text{ADP} + \text{H}^+ \xrightarrow[K^+]{Mg^{2+}} \text{Кетопируват} + \text{ATP}$$

$$\Delta G^{0'} = -7{,}5 \text{ ккал/моль.}$$

Эта суммарная реакция характеризуется очень большой отрицательной величиной $\Delta G^{0'}$, что в значительной мере обусловливается спонтанным превращением енольной формы пирувата в кетоформу. Изменение стандартной свободной энергии при гидролизе фосфоенолпирувата равно $-14{,}8$ ккал/моль. Приблизительно половина этой энергии запасается в форме ATP ($\Delta G^{0'} = -7{,}3$ ккал/моль), а вторая половина ($-7{,}5$ ккал/моль) составляет ту мощную движущую силу, которая резко смещает равновесие реакции вправо. В условиях клетки пируваткиназная реакция практически необратима.

Пируваткиназа была получена в кристаллическом виде (мол. масса 250000). Для проявления ее активности необходимы ионы K^+, а также Mg^{2+} или Mn^{2+}. Фермент этот принадлежит к числу важных регуляторных ферментов, и о его действии мы еще будем говорить ниже.

е. Восстановление пирувата до лактата

Важная роль пирувата в катаболизме углеводов определяется тем, что это соединение лежит в точке пересечения различных катаболических путей. При аэробных условиях в животных тканях продуктом гликолиза является пируват, а NADH, образовавшийся в ходе окисления глицеральдегид-3-фосфата, реокисляется (т. е. снова превращается в NAD^+) за счет молекулярного кислорода (гл. 17). Иначе обстоит дело в анаэробных условиях, например в напряженно работающих скелетных мышцах или в клетках молочнокислых бактерий. В этих условиях образовавшийся при гликолизе NADH реокисляется не за счет кислорода (который отсутствует), а за счет пирувата, восстанавливающегося при этом в лактат. Электроны, перешедшие сначала от глицеральдегид-3-фосфата на NAD^+, переносятся в форме NADH на пируват. Восстановление пирувата катализируется ферментом *лактатдегидрогеназой*; в результате лактатдегидрогеназной реакции образуется L-изомер лактата:

$$\text{Пируват} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-лактат} + \text{NAD}^+$$

$$\Delta G^{0'} = -6{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

Равновесие этой реакции сильно сдвинуто вправо, о чем свидетельствует большая отрицательная величина $\Delta G^{0'}$. При окислении двух молекул глицеральдегид-3-фосфата, образующихся из каждой молекулы глюкозы, расходуются две молекулы NAD^+ и синтезируются две молекулы NADH. Поэтому регенерация двух молекул NAD^+ в результате восстановления двух молекул пирувата до лактата означает, что NAD может использоваться в процессе гликолиза многократно.

Мы уже знаем (разд. 9.23), что лактатдегидрогеназа представлена в большей части тканей пятью различными изоформами, отличающимися друг от друга по таким признакам, как величина K_M для пирувата, число оборотов или V_{max} и степень аллостерического ингибирования пируватом. Изофермент, присутствующий в ткани сердца (его обозначают H_4), состоит из четырех идентичных полипептидных цепей, принадлежащих к Н-типу. Он характеризуется низкой величиной K_M для пирувата и сильно выраженной способностью ингибироваться пируватом. Другая изомерная форма этого фермента, содержащаяся в мышечной ткани (ее обозначают M_4), характеризуется более высокой величиной K_M для пирувата, не ингибируется пируватом и по своей каталитической активности превосходит изофермент, выделенный из сердца.

Предпринималось немало попыток с целью найти надлежащее объяснение функции и роли изоформ лактатдегидрогеназы в различных тканях, особенно в ткани сердца, скелетных мышцах и печени. Тем не менее в этом вопросе и сейчас еще много противоречий и споров. Роль изоформ лактатдегидрогеназы и двух генов, ответственных за их синтез, остается неясной. Был обнаружен любопытный факт: у одного из обследуемых, 64-летнего мужчины, полностью отсутствовала (вследствие генетического дефекта) лактатдегидрогеназа «сердечного» типа; при этом у него не отмечалось ни нарушений сердечной деятельности, ни каких-либо нарушений метаболизма. Это наводит на мысль, что, быть может, не все клеточные ферменты или не все белки действительно необходимы; возможно, среди них есть и рудиментарные, которые теперь уже не используются.

ж. Полный баланс гликолиза

Мы можем теперь составить полный баланс гликолиза, в котором будут учтены: 1) судьба углеродного скелета глюкозы, 2) путь электронов в окислительно-восстановительных реакциях и 3) расход ADP и фосфата в процессе гликолиза и выход ATP в расчете на одну расщепленную молекулу глюкозы. В левой части приведенного ниже уравнения указаны все вещества, используемые в процессе гликолиза, т. е. ATP, P_i, ADP, NAD^+, NADH и H^+ (см. рис. 15-4 и 15-5), а в правой части – все продукты гликолиза (напомним, что из каждой молекулы глюкозы образуются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата):

$$\text{Глюкоза} + 2ATP + 2P_i + 2NAD^+ + 2NADH + 2H^+ + 4ADP \rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ + 4ATP + 2H_2O + 2NADH + 2H^+ + 2NAD^+ + 2ADP.$$

Если мы теперь вычеркнем в правой и в левой частях уравнения одни и те же члены, то получим суммарное уравнение анаэробного гликолиза, протекающего в скелетных мышцах в условиях анаэробиоза и при молочнокислом брожении:

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP \rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ + 2ATP + 2H_2O.$$

В результате этого процесса одна молекула D-глюкозы превращается в две молекулы лактата (путь углерода). Две молекулы ADP и две молекулы фосфата превращаются в две молекулы ATP (путь фосфатных групп). Четыре электрона (в форме двух гидрид-ионов) переносятся с помощью двух молекул NAD^+ от двух молекул глицеральдегид-3-фосфата на две молекулы пирувата с образованием двух молекул лактата (путь электронов). Процесс гликолиза включает два окислительно-восстановительных этапа, однако суммарного изменения степени окисления углерода в результате этого процесса не происходит. В этом можно убедиться, сравнив эмпирические формулы глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) и молочной кислоты ($C_3H_6O_3$). Легко видеть, что соотношение атомов C, H и O в молекулах двух этих соединений одинаково и, следовательно, превращение глюкозы в молочную кислоту не сопровождается окислением углерода. Тем не менее при анаэробном гликолизе какая-то часть энергии, заключенной в молекуле глюкозы, все же извлекается; этой энергии достаточно для того, чтобы обеспечить суммарный выход двух молекул ATP в расчете на каждую расщепленную молекулу глюкозы.

В аэробных условиях продуктом гликолитического расщепления глюкозы оказывается не лактат, а пируват. В этих условиях NADH, образовавшийся в результате окисления двух молекул глицеральдегид-3-фосфата, вновь окисляется не за счет пирувата. Суммарное уравнение гликолиза в этом случае имеет вид

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP + 2NAD^+ \rightarrow 2\text{Пируват}^- + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O.$$

Две молекулы NADH, образовавшиеся при гликолизе в цитозоле, в аэробных ус-

ловиях вновь окисляются до NAD^+, отдавая свои электроны в цепь переноса электронов, которая в эукариотических клетках находится в митохондриях. Здесь электроны передаются в конечном счете на кислород, восстанавливая его до H_2O:

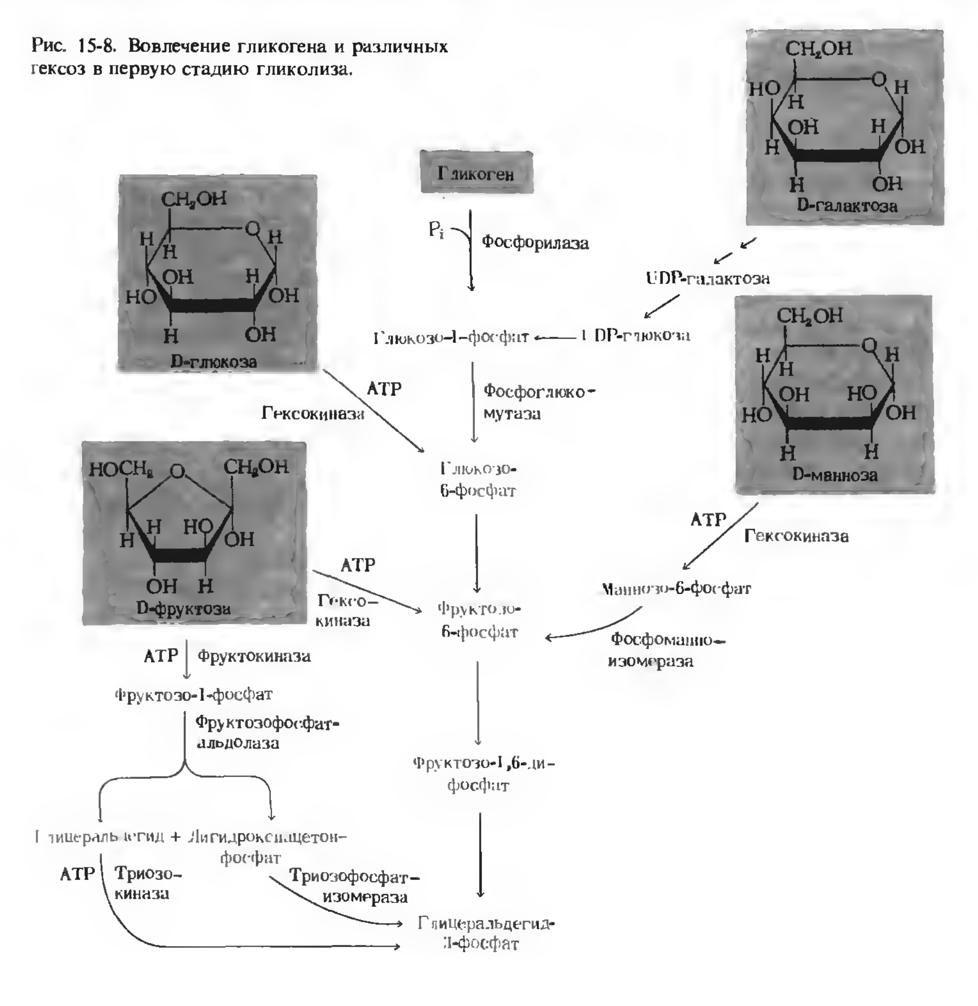
$$2NADH + 2H^+ + O_2 \rightarrow 2NAD^+ + 2H_2O.$$

15.8. Пути, ведущие от гликогена и других углеводов, к центральному гликолитическому пути

Не только D-глюкоза, но и многие другие углеводы вовлекаются после ряда превращений в гликолиз, высвобождая заключенную в них энергию. Среди этих углеводов главную роль играют запасные полисахариды – *гликоген* и *крахмал*, дисахариды – *мальтоза, лактоза* и *сахароза* и моносахариды – *фруктоза, манноза* и *галактоза*. Пути, по которым эти различные углеводы вступают на путь гликолиза, показаны на рис. 15-8.

D-глюкозные единицы боковых цепей гликогена и крахмала вовлекаются в гликолиз в результате последовательного действия двух ферментов – *гликоген-фосфорилазы* (или *фосфорилазы крахмала* у растений) и *фосфоглюкомутазы*. Гликоген-фосфорилаза, широко распространенная в животных клетках, катализирует изображенную ниже общую реакцию, в которой $(Глюкоза)_n$ означает боковую цепь гликогена (или крахмала),

Рис. 15-8. Вовлечение гликогена и различных гексоз в первую стадию гликолиза.



состоящую из *n* D-глюкозных единиц, соединенных $\alpha(1 \rightarrow 4)$-связями, а (Глюкоза)$_{n-1}$ – ту же боковую цепь, но только укороченную на одно звено в результате отщепления от ее конца одного остатка глюкозы (структуру гликогена и крахмала см. на рис. 11-15):

$$(\text{Глюкоза})_n + P_i \rightarrow (\text{Глюкоза})_{n-1} + \alpha\text{-D-глюкозо-1-фосфат}$$

$$\Delta G^{0\prime} = +0{,}73 \text{ ккал/моль.}$$

В условиях клетки, при относительно высокой концентрации фосфата, гликоген-фосфорилазная реакция идет только в сторону распада гликогена и образования глюкозо-1-фосфата. В этой реакции концевая α $(1 \rightarrow 4)$-гликозидная связь на нередуцирующем конце боковой цепи гликогена претерпевает *фосфоролиз*: под действием фосфата от цепи отщепляется концевой остаток глюкозы с образованием α-D-глюкозо-1-фосфата. Боковая цепь гликогена становится в результате этой реакции короче на одну глюкозную единицу (рис. 15-9). Гликоген-фосфорилаза атакует нередуцирующие концы боковых цепей гликогена многократно, до тех пор пока она не дойдет до точки, отстоящей на четыре глюкозные единицы от α $(1 \rightarrow 6)$-связи (рис. 11-15). Здесь ее действие прекращается.

Для того чтобы расщепление гликогена под действием гликоген-фосфорилазы могло продолжаться, на полисахарид должен предварительно подействовать другой фермент, α *(1 → 6)-глюкозидаза.* Этот фермент катализирует две реакции. В первой из них он отщепляет от цепи три глюкозных остатка из упомянутых четырех и переносит их на конец какой-нибудь другой внешней боковой цепи. Во второй реакции, катализируемой α $(1 \rightarrow 6)$-глюкозидазой, отщепляется четвертый глюкозный остаток, присоединенный в точке ветвления $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связью. Гидролиз $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связи в точке ветвления приводит к образованию одной молекулы D-глюкозы и от-

Рис. 15-9. Удаление концевого остатка глюкозы на нередуцирующем конце одной из цепей гликогена под действием гликоген-фосфорилазы. Этот процесс многократно повторяется, и остатки глюкозы отщепляются один за другим до тех пор, пока концевым не окажется остаток, четвертый по счету от точки ветвления (см. текст). Обратите внимание на условное обозначение гидроксильных групп остатков глюкозы; водородные атомы, присоединенные к пиранозным кольцам, не показаны.

крывает для действия гликоген-фосфорилазы новый участок цепи, состоящий из остатков глюкозы, соединенных α (1 → → 4)-связями.

Глюкозо-1-фосфат – конечный продукт реакции, катализируемой гликоген-фосфорилазой (фосфорилазой крахмала), превращается в глюкозо-6-фосфат под действием фермента *фосфоглюкомутазы*. Этот фермент (он был выделен в чистом виде из многих источников) катализирует обратимую реакцию:

Глюкозо-1-фосфат ⇌

⇌ Глюкозо-6-фосфат

$\Delta G^{0'} = -1{,}74$ ккал/моль.

Рис. 15-10. α-D-глюкозо-1,6-дифосфат – один из кофакторов, необходимых для действия фосфоглюкомутазы.

Для действия фосфоглюкомутазы необходим в качестве кофактора глюкозо-1,6-дифосфат (рис. 15-10). Роль этого кофактора станет ясной, если учесть промежуточные этапы действия фермента. Из приведенной ниже последовательности реакций видно, что фермент пребывает попеременно в одной из двух форм – фосфорилированной и нефосфорилированной, или дефосфорилированной:

Фосфофермент +

+ Глюкозо-1-фосфат ⇌

⇌ Дефосфофермент +

+ Глюкозо-1,6-дифосфат

Глюкозо-1,6-дифосфат +

+ Дефосфофермент ⇌

⇌ Фосфофермент +

+ Глюкозо-6-фосфат

Суммарное уравнение:

Глюкозо-1-фосфат ⇌

⇌ Глюкозо-6-фосфат

Фосфоглюкомутаза примечательна и еще в одном отношении: этот фермент является представителем обширного класса ферментов, у которых в активном центре присутствует остаток серина, необходимый для каталитической активности. Именно этот остаток серина участвует во взаимодействии с глюкозо-1,6-дифосфатом – его гидроксильная группа этерифицируется фосфорной кислотой. Ферменты серинового класса (рис. 9-12), к которым принадлежит и фосфоглюкомутаза, необратимо ингибируются некоторыми органическими фосфатами, такими, как, например, диизопропилфторфосфат. При этом ингибиторы взаимодействуют с гидроксильной группой упомянутого остатка серина, в результате чего образуется фосфорилированное производное фермента, лишенное каталитической активности (рис. 9-10).

15.9. В гликолиз могут вовлекаться и другие простые сахара

В животном организме гликолизу подвергается не только глюкоза, но и другие моносахариды, которые после соответствующих превращений тоже могут расщепляться и высвобождать заключенную в них энергию (рис. 15-8).

D-фруктоза, присутствующая в свободном виде во многих фруктах и образующаяся в тонком кишечнике из сахарозы (называемой также тростниковым или свекловичным сахаром), может фосфорилироваться в присутствии гексокиназы, которая действует на большое число различных гексоз:

D-фруктоза + ATP $\xrightarrow{Mg^{2+}}$

$\xrightarrow{Mg^{2+}}$ D-фруктозо-6-фосфат +

+ ADP + H^+.

Таков главный путь включения фруктозы в гликолиз в мышечной ткани и в почках.

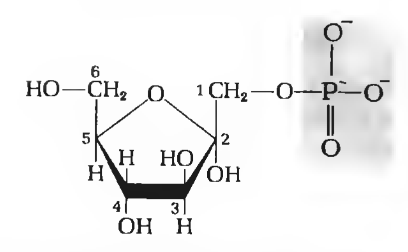


Рис. 15-11. α-D-фруктозо-1-фосфат – промежуточный продукт на пути превращения фруктозы в глицеральдегидфосфат.

В печени, однако, для этого существует другой путь. Присутствующая здесь фруктокиназа катализирует фосфорилирование фруктозы не по 6-му, а по 1-му атому углерода (рис. 15-11):

$$\text{D-фруктоза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{D-фруктозо-1-фосфат} + \text{ADP} + H^+.$$

Затем под действием *альдолазы* фруктозо-1-фосфат расщепляется с образованием D-глицеральдегида и дигидроксиацетонфосфата:

$$\text{D-фруктозо-1-фосфат} \rightleftharpoons \text{D-глицеральдегид} + \text{Дигидроксиацетонфосфат}.$$

Дигидроксиацетонфосфат является, как известно, одним из промежуточных продуктов гликолиза, превращающимся в глицеральдегид-3-фосфат. Другой продукт изображенной выше реакции, D-глицеральдегид, фосфорилируется под действием фермента *триозокиназы* за счет ATP, что также приводит к глицеральдегид-3-фосфату:

$$\text{D-глицеральдегид} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{D-глицеральдегид-3-фосфат} + \text{ADP} + H^+.$$

Таким образом, в печени из молекулы D-фруктозы образуются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата.

D-галактоза, образующаяся в результате гидролиза дисахарида лактозы (молочного сахара) сначала фосфорилируется по 1-му атому углерода под действием фермента *галактокиназы* за счет ATP:

$$\text{ATP} + \text{D-галактоза} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{D-галактозо-1-фосфат} + \text{ADP} + H^+.$$

Продукт этой реакции, D-галактозо-1-фосфат, превращается в свой C_4-эпимер, т.е. в D-глюкозо-1-фосфат. Превращение осуществляется в несколько этапов (рис. 15-12). В этих реакциях принимает участие уридиндифосфат (UDP), функционирующий в качестве переносчика гексозных групп наподобие кофермента. В печени человека галактозо-1-фосфат взаимодействует с UDP-глюкозой, что приводит к образованию UDP-D-галактозы и глюкозо-1-фосфата. Эту реакцию катализирует фермент UDPглюкоза: α-D-галактозо-1-фосфат уридилилтрансфераза. Остаток галактозы в молекуле UDP-D-галактозы претерпевает затем катализируемую ферментом UDPглюкоза-эпимеразой (рис. 15-12) эпимеризацию при 4-м углеродном атоме, в результате чего образуется UDP-D-глюкоза. UDPглюкоза-пирофосфорилаза катализирует расщепление UDP-глюкозы с образованием D-глюкозо-1-фосфата, который под действием фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат. Эта последовательность реакций ответственна не только за превращение D-галактозы в D-глюкозу; она же используется и для обратного процесса – для синтеза D-галактозы в молочных железах (где D-галактоза необходима для образования лактозы, или молочного сахара). Важная роль UDP в качестве переносчика гликозильных групп выявлена благодаря работам аргентинского биохимика Луиса Лелуара. Позже мы познакомимся с другими метаболическими путями, где промежуточными продуктами служат также UDP-производные сахаров.

При одной из самых обычных форм такого врожденного нарушения обмена,

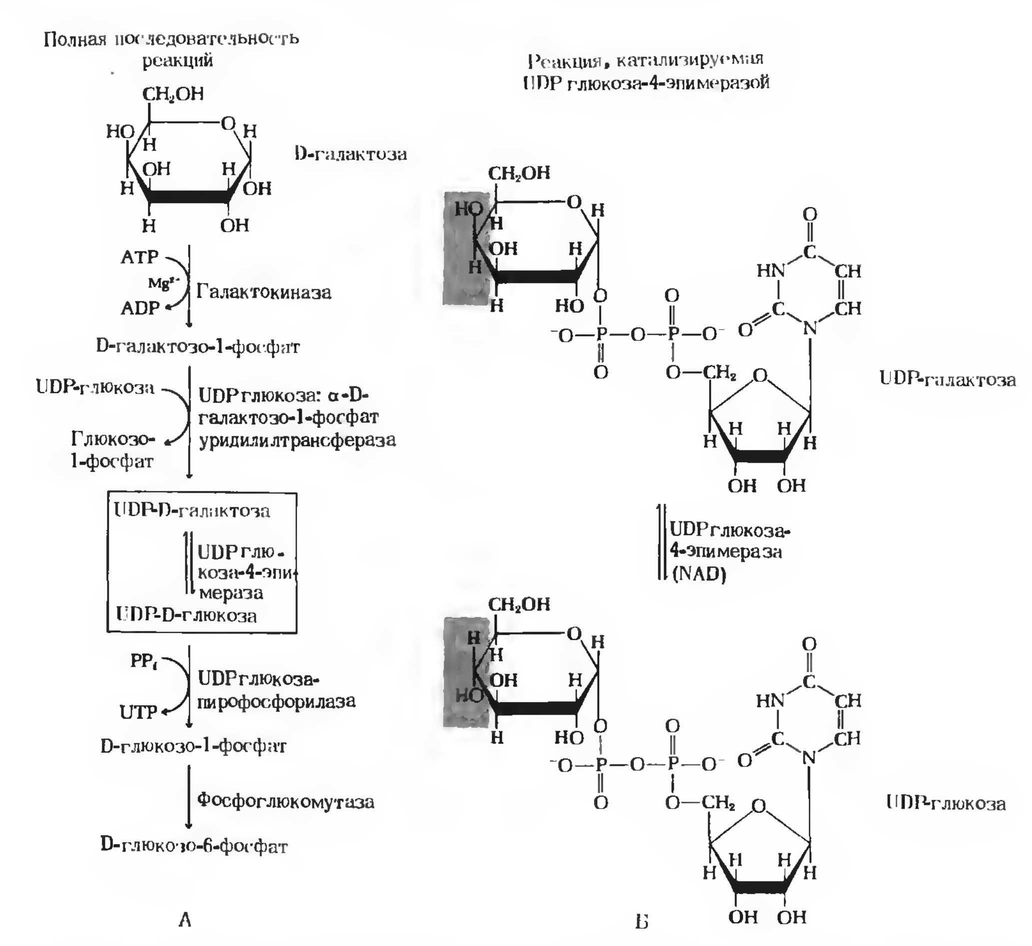


Рис. 15-12. *А*. Путь превращения D-галактозы в D-глюкозу. *Б*. Более подробное изображение UDPглюкоза–4-эпимеразной реакции (на рис. *А* этот этап выделен рамкой). NAD, который необходим ферменту, катализирующему взаимопревращение UDP-глюкозы и UDP-галактозы, по-видимому, принимает два водорода от четвертого углеродного атома остатка глюкозы, а затем возвращает их с образованием эпимера по четвертому атому углерода.

Недостаточность фермента UDPглюкоза: α-D-галактозо-1-фосфат-уридилилтрансферазы обусловливает галактоземию – наследственное заболевание человека, проявляющееся в раннем детстве. Поскольку превращение галактозы в глюкозу при этом нарушено, галактоза и галактозо-1-фосфат, образующиеся при переваривании лактозы, накапливаются в тканях, вызывая повреждения мозга и печени, а также помутнение хрусталика (катаракту). Свободная галактоза обнаруживается в значительных количествах также и в крови. Одна из более легких форм галактоземии вызывается недостаточностью галактокиназы.

как галактоземия, в организме человека вследствие генетической аномалии отсутствует фермент UDPглюкоза: α-D-галактозо-1-фосфат уридилилтрансфераза. Превращение D-галактозы в D-глюкозу оказывается в таком случае невозможным. Из-за нарушения способности организма метаболизировать D-галактозу и D-галактозо-1-фосфат эти соединения накапливаются в крови и в тканях. При этом печень и некоторые другие органы увеличиваются, ухудшается зрение из-за помутнения хрусталика (катаракта) и задерживается умственное развитие. Поскольку главным источником D-галактозы служит лактоза молока, это врожденное нарушение обмена проявляется в детском возрасте. Проявления галактоземии могут быть существенно смягчены, если устранить из рациона мо-

локо и молочные продукты. Другие формы галактоземии наблюдаются при генетических аномалиях, обусловливающих недостаточность галактокиназы или UDPглюкоза – 4-эпимеразы.

D-манноза, которая образуется при переваривании различных полисахаридов и гликопротеинов, содержащихся в пище, фосфорилируется по положению 6 под действием фермента *гексокиназы*:

$$\text{D-манноза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{D-маннозо-6-фосфат} + \text{ADP} + H^+.$$

Затем *фосфоманноизомераза* катализирует изомеризацию D-маннозо-6-фосфата с образованием D-фруктозо-6-фосфата, который принадлежит к числу промежуточных продуктов гликолиза:

$$\text{D-маннозо-6-фосфат} \rightleftharpoons \text{D-фруктозо-6-фосфат.}$$

На рис. 15-8 изображены все эти пути, по которым различные сахара направляются на центральный гликолитический путь.

15.10. Дисахариды должны предварительно подвергнуться гидролизу до моносахаридов

Дисахариды сами по себе не способны включаться в гликолиз. Если, например, ввести их непосредственно в кровь, то они не будут утилизироваться. Для того чтобы организм мог использовать содержащиеся в пище дисахариды, они должны сначала подвергнуться ферментативному гидролизу в клетках, выстилающих тонкий кишечник, т.е. должны расщепиться до тех гексозных единиц, из которых они состоят:

$$\text{Мальтоза} + H_2O \xrightarrow{\text{Мальтаза}} \text{D-глюкоза} + \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Лактоза} + H_2O \xrightarrow{\text{Лактаза}} \text{D-галактоза} + \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Сахароза} + H_2O \xrightarrow{\text{Сахараза}} \text{D-фруктоза} + \text{D-глюкоза}$$

Образовавшиеся простые сахара всасываются затем в кровь и поступают в печень, где они фосфорилируются и превращаются в промежуточные продукты гликолиза, как описано выше.

Непереносимость лактозы (разд. 11.5 и 24.1, а) у некоторых групп населения (исключение в этом смысле составляют жители Северной Европы и некоторых районов Африки) связана с полным или частичным исчезновением у взрослых людей лактазной активности в клетках кишечного эпителия. У таких людей лактоза в кишечнике полностью не переваривается и не всасывается, что вызывает у них поносы. Проблема эта не слишком серьезна, поскольку в тех районах, где распространена непереносимость лактозы, взрослые люди не употребляют в пищу молока. Какой-либо связи между непереносимостью лактозы и галактоземией не обнаружено; непереносимость лактозы встречается очень часто, тогда как галактоземия – заболевание крайне редкое.

15.11. Вовлечение остатков глюкозы в процесс гликолиза регулируется

Скорости главных катаболических реакций, обеспечивающих расщепление глюкозы и извлечение химической энергии в форме ATP, в каждый данный момент регулируются в соответствии с потребностями клетки в ATP независимо от того, как будет затем этот ATP использоваться – в биосинтетических реакциях, для активного переноса веществ или для механической работы в сократительных структурах. Поскольку продукты расщепления глюкозы играют важную роль и в качестве предшественников, и как промежуточные продукты других метаболических процессов, регуляторные ферменты катаболизма углеводов распознают также соответствующие сигналы других метаболических путей и отвечают на эти сигналы. Теперь мы

познакомимся с теми регуляторными ферментами, которые регулируют скорость расщепления углеводов на гликолитическом пути.

Рассмотрим прежде всего, как регулируется само вступление остатков глюкозы на путь гликолиза. Вовлечение глюкозных остатков в процесс гликолиза обеспечивают две важные реакции, и обе эти реакции контролируются регуляторными ферментами. Первая такая реакция – это катализируемое *гексокиназой* фосфорилирование свободной глюкозы в положении 6 за счет ATP. В некоторых тканях, например в скелетных мышцах, гексокиназа функционирует как аллостерический фермент и ингибируется продуктом реакции глюкозо-6-фосфатом, как это показано на рис. 15-13. Всякий раз, когда концентрация глюкозо-6-фосфата в клетке сильно возрастает, т. е. когда он образуется быстрее, чем потребляется, наступает ингибирование – гексокиназа под действием глюкозо-6-фосфата выключается и дальнейшего фосфорилирования глюкозы не происходит до тех пор, пока избыток глюкозо-6-фосфата не будет использован. В печени, однако, преобладает другой фермент – глюкокиназа, который не ингибируется глюкозо-6-фосфатом (разд. 15.6,а). Поэтому в печени, способной хранить большие количества гликогена, избыточная глюкоза крови может фосфорилироваться с образованием глюкозо-6-фосфата, который затем через глюкозо-1-фосфат превращается в гликоген, т. е. в запасной полисахарид. При повышении концентрации глюкозы в крови гормон инсулин, выделяемый поджелудочной железой в кровь, стимулирует синтез глюкокиназы. При диабете и во время голодания глюкокиназная активность понижена.

Во второй реакции, поставляющей глюкозные остатки для процесса гликолиза, субстратом служит гликоген. Эта реакция катализируется *гликоген-фосфорилазой*, которая также представляет собой регуляторный фермент. Как в печени, так и в мышцах гликоген-фосфорилаза занимает стратегически важную позицию между резервуаром топлива – гликогеном и гликолитической системой, назначение которой состоит в использовании топлива. В скелетных мышцах этот фермент присутствует в двух формах – в каталитически активной фосфорилированной форме (*фосфорилаза a*) и в значи-

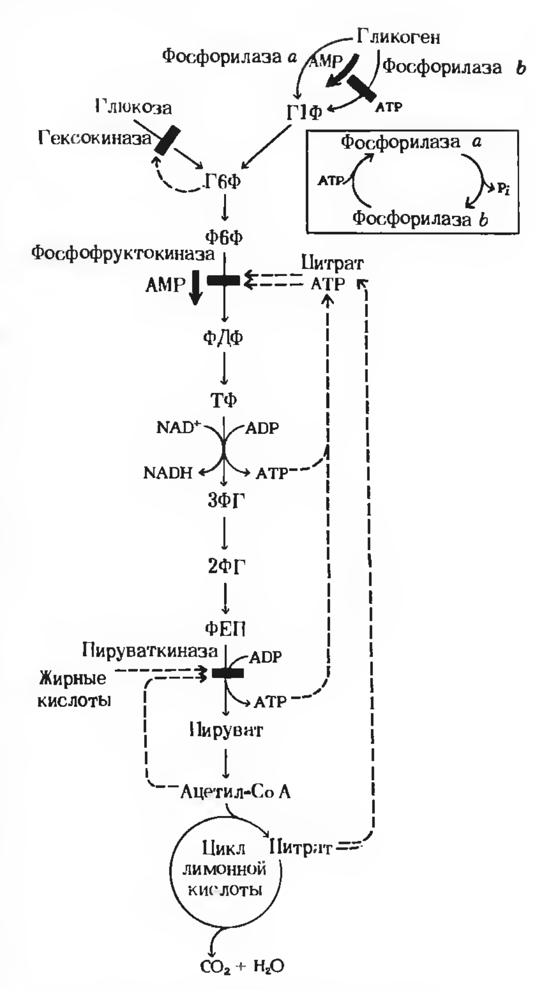


Рис. 15-13. Механизм, с помощью которого регулируется включение остатков глюкозы в процесс гликолиза и расщепление их на этом пути. Регуляторное ингибирование обозначено красными прерывистыми стрелками, указывающими на блокируемый этап (красная полоска поперек стрелки, показывающей направление реакции); регуляторное стимулирование обозначено красными жирными стрелками, параллельными стрелкам, показывающим направление реакции. Г1Ф – глюкозо-1-фосфат; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФДФ – фруктозо-1,6-дифосфат; ТФ – триозофосфат; 3ФГ – 3-фосфоглицерат; 2ФГ – 2-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпируват.

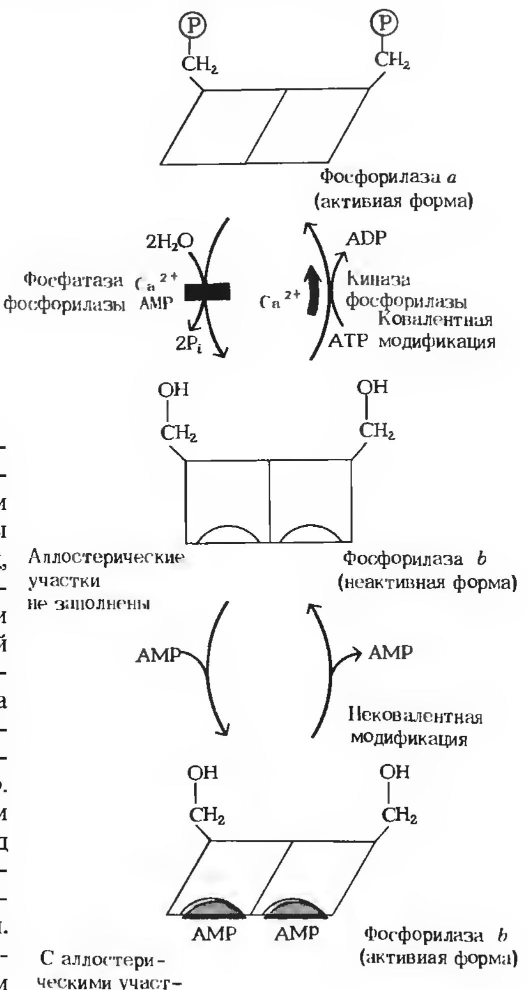


Рис. 15-14. Регуляция активности гликоген-фосфорилазы. Молекула этого фермента состоит из двух субъединиц. В каждой из них имеется важный для каталитической активности остаток серина. По гидроксильной группе этого остатка серина обе субъединицы фермента фосфорилируются под действием киназы фосфорилазы, в результате чего образуется фосфорилаза *a*. Эта реакция стимулируется ионами Ca^{2+}. Дефосфорилирование фосфорилазы *a* подавляется ионами Ca^{2+} и AMP. Фосфорилаза *b* может активироваться также в результате нековалентного связывания AMP в аллостерических участках молекулы фермента. Конформационные изменения, которые претерпевает фермент, представлены здесь в схематическом виде.

тельно менее активной дефосфорилированной форме (*фосфорилаза b*). Фосфорилаза *a* была получена в кристаллическом виде (мол. масса 190000). Ее молекулы состоят из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит существенный для каталитической активности остаток серина в фосфорилированной форме (рис. 15-14). Скорость превращения структурных единиц гликогена в глюкозо-1-фосфат регулируется в мышцах соотношением активной фосфорилазы *a* и менее активной фосфорилазы *b*.

Взаимопревращения двух этих форм гликоген-фосфорилазы происходят под действием специфичных ферментов, катализирующих процесс ковалентной модификации (разд. 9.22) фосфорилазы. Фосфорилаза *a* превращается в менее активную фосфорилазу *b* под действием фермента, называемого *фосфатазой фосфорилазы a*; этот фермент, катализируя гидролитический разрыв связей, удаляет из молекулы фосфорилазы *a* фосфатные группы, необходимые для каталитической активности (рис. 15-14). Фосфорилаза *b* вновь превращается в активную фосфорилазу *a* под действием фермента, называемого *киназой фосфорилазы b*; он катализирует реакцию, в ходе которой ATP фосфорилирует остатки серина в активном центре молекулы фосфорилазы *b*, что и приводит к образованию фосфорилазы *a*. Таким образом, благодаря действию двух ферментов, фосфатазы фосфорилазы *a* и киназы фосфорилазы *b*, соотношение активной фосфорилазы *a* и сравнительно мало активной фосфорилазы *b* в клетке может изменяться.

В мышцах действует второй механизм регуляции гликоген-фосфорилазной активности. Фосфорилаза *b*, сравнительно мало активная форма, может становиться более активной в результате нековалентного связывания с аллостерическим модулятором этого фермента, которым является AMP; концентрация же AMP в мышцах возрастает по мере распада ATP в сократительных системах (рис. 15-14, см. также разд. 14.17). Активации фосфорилазы *b* под действием AMP препятствует ATP, выступающий в роли отрицательного модулятора. Таким образом, активность фосфорилазы

b определяется соотношением AMP и ATP. В отличие от фосфорилазы *b* фосфорилаза *a* не активируется AMP; поэтому фосфорилазу *a* называют иногда AMP-независимой формой, а фосфорилазу *b*–AMP-зависимой. Итак, есть два механизма регуляции, которым подчиняется гликоген-фосфорилаза скелетной мышцы: 1) ковалентная модификация посредством фосфорилирования или дефосфорилирования остатков серина в активном центре фермента и 2) аллостерическая регуляция фосфорилазы *b* путем нековалентного связывания с AMP или ATP. В покоящейся мышце почти вся фосфорилаза находится в неактивной, или *b*-форме, поскольку в такой мышце концентрация ATP гораздо выше, чем концентрация AMP.

15.12. Взаимопревращения фосфорилазы *a* и фосфорилазы *b* регулируются в конечном счете гормонами

Выше мы видели, что взаимопревращения фосфорилазы *a* и фосфорилазы *b* в мышцах осуществляются под действием двух ферментов – фосфатазы фосфорилазы *a* и киназы фосфорилазы *b*. Их совместное действие и определяет в итоге соотношение фосфорилаз *a* и *b*, а следовательно, и скорость расщепления гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата. Естественно задать вопрос: а чем же в свою очередь регулируется активность фосфатазы фосфорилазы и киназы фосфорилазы?

Позднее мы ответим на этот важный вопрос более подробно (гл. 25), сейчас же скажем только, что если организм оказывается внезапно в критической ситуации, то мозговое вещество надпочечника выделяет в кровь гормон адреналин, который служит молекулярным сигналом для печени и мышц. Под влиянием этого сигнала печень включает свою гликоген-фосфорилазу, в результате чего повышается уровень глюкозы в крови, т.е. мышцы получают топливо. Этот же сигнал включает в скелетных мышцах расщепление гликогена с образованием лактата, благодаря чему усиливается образование ATP, требующегося для преодоления критической ситуации. Через длинный ряд последовательных реакций (их мы рассмотрим позже) адреналин в конце концов стимулирует активность киназы фосфорилазы *b*, так что отношение фосфорилазы *a* к фосфорилазе *b* резко возрастает. Когда напряжение снимается и адреналин перестает выделяться в кровь, активность киназы фосфорилазы *b* возвращается к своему исходному, более назкому, уровню; соответственно возвращается к норме также и отношение фосфорилазы *a* к фосфорилазе *b* (гл. 25).

В печени гликоген-фосфорилаза также присутствует в *a*- и *b*-форме; в принципе ферменты печени функционируют подобно мышечным, от которых они, впрочем, несколько отличаются по своей структуре и регуляторным свойствам. Расщепление гликогена в печени имеет иное назначение, нежели в мышцах; этот процесс служит источником свободной глюкозы крови. Под действием фосфорилазы печени образуется глюкозо-1-фосфат, который затем превращается в глюкозо-6-фосфат, являющийся уже непосредственным предшественником свободной глюкозы. Реакция, в ходе которой образуется D-глюкоза крови, катализируется ферментом глюкозо-6-фосфатазой:

$$\text{D-глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{D-глюкоза} + P_i.$$

Таким образом, вызываемая в печени действием адреналина стимуляция образования фосфорилазы *a* из фосфорилазы *b* приводит к повышению концентрации глюкозы в крови и тем самым подготавливает организм к преодолению критической ситуации. О распаде и синтезе гликогена и о регуляции этих процессов мы еще будем говорить более подробно (гл. 20 и 25).

15.13. Сама последовательность гликолитических реакций регулируется на двух главных этапах

Скорость гликолиза регулируется не только за счет вовлечения в этот процесс

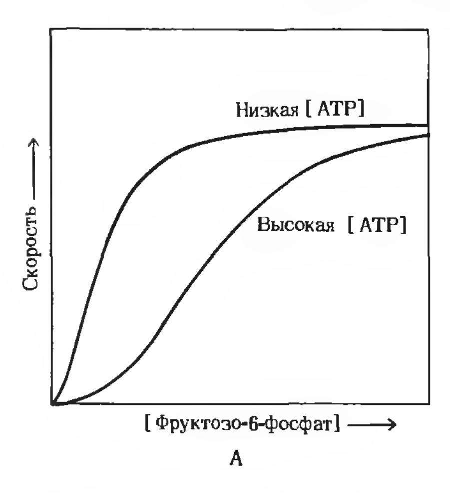
свободной глюкозы или же глюкозильных остатков гликогена, как это описано выше; биологическому контролю подчиняется и сама последовательность реакций на пути от глюкозо-6-фосфата до пирувата. В этой последовательности имеются два главных регулируемых этапа: один из них катализируется *фосфофруктокиназой*, а другой – *пируваткиназой*.

Фосфофруктокиназа (ФФК) – это сложный аллостерический фермент, управляемый многими положительными и отрицательными модуляторами. Механизмам его регуляции (у разных клеток различным) посвящены десятки научных статей. В скелетных мышцах активность фосфофруктокиназы определяется концентрациями субстратов этого фермента (АТР и фруктозо-6-фосфата) и его продуктов (ADP и фруктозо-1,6-дифосфата); все эти соединения играют роль аллостерических регуляторов. Очень важны также в качестве регуляторов АМР, цитрат, ионы Mg^{2+}, фосфат и некоторые другие метаболиты, присутствующие в мышечной ткани (табл. 15-1). Однако, хотя регуляции ФФК зависит от сложного взаимодействия ряда факторов, главными отрицательными модуляторами этого фермента являются АТР и цитрат, а самыми активными положительными модуляторами – АМР и фруктозо-1,6-дифосфат. Всякий раз, когда при очень активном мышечном сокращении концентрация АТР падает, а энергии требуется больше, фосфофруктокиназная активность усиливается, даже если концентрация фруктозо-6-фосфата очень низка (об этом свидетельствует тот факт, что зависимость скорости реакции от концентрации описывается гиперболой; рис. 15-15, *А*). Если, однако, уровень АТР в клетке уже высок по сравнению с уровнем ADP и АМР, то кажущееся сродство фосфофруктокиназы к фруктозо-6-фосфату сильно снижается (на это указывает S-образная форма кривой на рис. 15-15, *А*). В этом случае фосфофруктокиназа будет катализировать реакцию лишь при сравнительно высокой концентрации фруктозо-6-фосфата. Цитрат, один из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, усиливает ингибирование фосфофруктокиназы высокими концентрациями АТР. В то же время повышение концентрации АМР, образующегося в результате аденилаткиназной реакции в сокращающейся мышце (см. рис. 14-17), служит очень мощным стимулирующим модулятором и противодействует ингибирующему влиянию АТР на фосфофруктокиназную реакцию (рис. 15-15, *Б*). В результате всех этих сложных аллостерических взаимодействий скорость реакции, катализируемой фосфофруктокиназой, возрастает иногда в сотни раз при переходе скелетной мышцы из состояния покоя к состоянию максимальной активности.

Вторым регулируемым этапом гликолиза является *пируваткиназная реакция*. Пируваткиназа также принадлежит к числу аллостерических ферментов. Этот фермент встречается по меньшей мере в трех изоформах (разд. 9.23), которые отличаются друг от друга по распределению в тканях и по реакции на различные модуляторы. При высоких концентрациях АТР кажущееся сродство пируваткиназы к фосфоенолпирувату сравнительно невелико и соответственно невелика скорость пируваткиназной реакции при обычных концентрациях фосфоенолпирувата. Пируваткиназу ингибируют также ацетил-СоА и высокомолекулярные жирные кислоты – соединения, играющие важную роль в качестве топлива для цикла лимонной кислоты. Таким образом, когда в клетке уже велика концентрация АТР или когда в ней уже достаточно топлива для процесса дыхания, обеспечивающего клетку энергией,

Таблица 15-1. Некоторые аллостерические активаторы и ингибиторы фосфофруктокиназы

Активаторы	Ингибиторы
АМР	АТР
Фруктозо-1,6-дифосфат	Цитрат
ADP	Mg^{2+}
Фосфат, K^{+}	Ca^{2+}



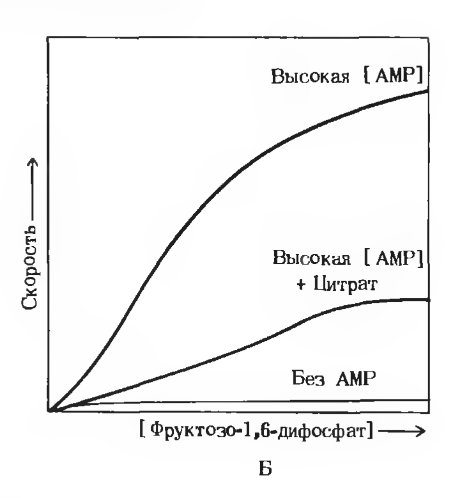


Рис. 15-15. Некоторые факторы, от которых зависит аллостерическая регуляция фосфофруктокиназы мышц. *А*. Влияние концентрации АТР и фруктозо-6-фосфата на скорость фосфофруктокиназной реакции. При низких концентрациях АТР величина K_M фосфофруктокиназы для фруктозо-6-фосфата сравнительно невелика, и потому этот фермент даже при относительно низких концентрациях фруктозо-6-фосфата может функционировать с большой скоростью. При высоких концентрациях АТР K_M фермента для фруктозо-6-фосфата резко возрастает, о чем свидетельствует S-образная форма кривой. *Б*. Влияние AMP, цитрата и фруктозо-1,6-дифосфата. Фруктозо-1,6-дифосфат является мощным активатором, но для максимальной стимуляции ему требуется присутствие AMP. Цитрат же действует как мощный ингибитор.
Здесь представлены лишь немногие из тех сложных взаимодействий, которые могут иметь место между многочисленными аллостерическими модуляторами фосфофруктокиназы.

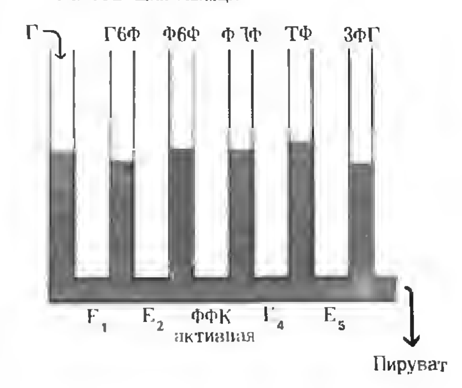
гликолиз ингибируется за счет либо фосфофруктокиназы, либо пируваткиназы (в зависимости от условий). В то же время при низких концентрациях АТР кажущееся сродство пируваткиназы к фосфоенолпирувату возрастает, и это позволяет ферменту переносить фосфатные группы от фосфоенолпирувата на ADP даже при относительно низкой концентрации фосфоенолпирувата. Некоторые аминокислоты также действуют как модуляторы пируваткиназной активности, главным образом в печени.

Во всех клетках гликолиз регулируется с очень высокой эффективностью, напоминающей действие компьютера, а потому изменения концентрации различных метаболитов могут влиять на его общую скорость. Столь сложная регуляция не должна вызывать у нас удивление, поскольку гликолиз – древнейший катаболический путь, занимающий центральное место в метаболизме.

15.14. Каким образом можно выявить регулируемые этапы гликолиза в интактных клетках?

Различные регуляторные эффекты на таких аллостерических ферментах, как фосфофруктокиназа, легко можно наблюдать в пробирке в опытах с очищенными ферментными препаратами. Возникает, однако, естественный вопрос: откуда, в сущности, нам известно, что фосфофруктокиназная реакция представляет собой один из главных регулируемых этапов гликолиза в *интактных клетках*? Получить ответ на этот вопрос позволяют измерения, показывающие, как в интактных клетках или тканях изменяются концентрации различных промежуточных продуктов гликолиза при изменении скорости этого процесса. Обратимся вновь к рис. 15-13. Представим себе, что мы имеем дело с покоящейся мышцей и что гликолиз на всем пути от глюкозо-6-фосфата до пирувата протекает в ней с постоянной скоростью, так что и концентрации всех его промежуточных продуктов тоже постоянны, т. е.

поддерживается стационарное состояние. Попробуем теперь внезапно ингибировать фосфофруктокиназную реакцию. При этом резко повысится концентрация ее субстрата, т.е. фруктозо-6-фосфата, который станет накапливаться, и понизится концентрация продукта этого фермента, фруктозо-1,6-дифосфата, а также всех последующих промежуточных продуктов гликолиза, поскольку их превращение в пируват будет продолжаться с той же скоростью, что и раньше. Этап, на котором происходит превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат и о котором известно, что концентрация первого из этих веществ возрастает, а второго – снижается, если фосфофруктокиназа ингибируется, может служить конкретным примером *пункта перекреста*. Пункт перекреста является тем местом, в котором осуществляется регуляция данной ферментной системы при ее переходах из состояния покоя в состояние активности и обратно. Рис. 15-16 поясняет роль пункта перекреста с помощью аналогии на модели гидравлической системы. Измеряя концентрации различных промежуточных продуктов какого-либо метаболического пути и выясняя, как изменяются эти концентрации в ответ на изменение общей скорости данного метаболического пути в интактной ткани, мы можем таким способом установить, какие именно из реакций этого метаболического пути регулируются. С помощью этого методического подхода было установлено, что главным регуляторным этапом гликолиза в скелетных мышцах, мозге и прочих тканях является фосфофруктокиназная реакция. Для того чтобы определить и сравнить концентрации всех промежуточных продуктов данного пути в покоящихся и в стимулированных клетках, пользуются следующим способом. Клетки или ткани быстро замораживают в жидком азоте и тем самым подавляют в них ферментативную активность (этот метод получил название «фиксация замораживанием»). Затем из замороженной ткани экстрагируют промежуточные продукты с помощью какого-нибудь кислого реактива, который вызывает денатурацию и инак-



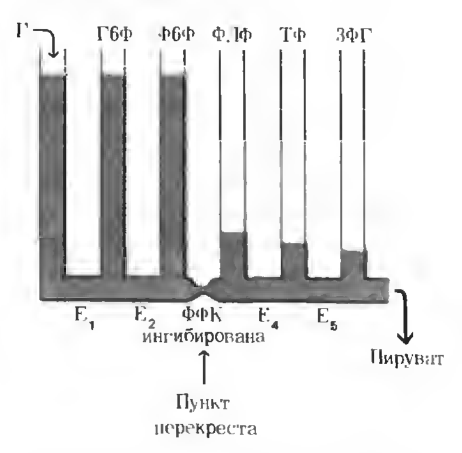


Рис. 15-16. Гидравлическая модель, поясняющая роль пункта перекреста в регуляции гликолиза, протекающего в мышце. Измерение концентраций последовательных промежуточных продуктов гликолиза в активной интактной мышце (*А*) и в мышце, находящейся в состоянии покоя (*Б*), позволяет выявить регулируемый этап этого процесса. Пункт перекреста – это реакция, катализируемая ферментом, для которого при переходе мышцы из активного состояния в состояние покоя концентрация субстрата возрастает, а концентрация продукта (продуктов) снижается. В данном случае пунктом перекреста служит реакция, катализируемая фосфофруктокиназой (ФФК), от которой зависит скорость образования пирувата. Г – глюкоза; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФДФ – фруктозо-1,6-дифосфат; ТФ – триозофосфат; 3ФГ – 3-фосфоглицерат. Здесь показаны не все промежуточные продукты гликолиза.

тивацию ферментов, и определяют концентрации этих промежуточных продуктов в тканевых экстрактах.

В любой данный момент времени при данных условиях скорость расщепления глюкозы (или гликогена) до пирувата определяется только одной из регуляторных реакций гликолиза. Почему же в таком случае в гликолизе регулируется не одна реакция, а несколько? Объясняется это тем, что метаболизм – очень сложный процесс. При определенных метаболических ситуациях клетке выгоднее регулировать скорость гликолиза за счет скорости вовлечения в гликолиз остатков глюкозы, т. е. через гексокиназную или гликоген-фосфорилазную реакцию. В других условиях более выгодной для клетки может оказаться регуляция через фосфофруктокиназную или пируваткиназную реакцию. Поскольку метаболические активности и функции, а также «топливные смеси» в различных тканях и клетках не совсем одинаковы, гликолиз при разных метаболических условиях может регулироваться в них через разные регуляторные пункты. Наличие нескольких регуляторных пунктов на центральном гликолитическом пути обеспечивает клетке большую метаболическую гибкость.

Важно иметь в виду и два других обстоятельства, касающихся регуляции гликолиза и вообще любого метаболического пути. 1) Регулируемые этапы какого-либо метаболического пути при внутриклеточных условиях обычно необратимы. Фосфорилаза, гексокиназа, фосфофруктокиназа и пируваткиназа – все эти ферменты катализируют реакции, сопровождающиеся в условиях клетки значительным уменьшением свободной энергии и потому практически необратимые. 2) Почти все другие, т. е. нерегулируемые, ферментативные этапы гликолиза находятся в состоянии равновесия или близки к нему. Однако, поскольку гликолиз включает необратимые этапы, весь этот процесс в целом также должен быть необратим. В интактной клетке многие отдельные ферментативные реакции могут быть близки к равновесию, однако в целом ни сами живые организмы, ни их метаболические функции никогда не находятся в состоянии равновесия.

15.15. Спиртовое брожение отличается от гликолиза только на последних этапах

У дрожжей и у других микроорганизмов, сбраживающих глюкозу не до лактата, а до этанола и CO_2, путь ферментативного расщепления глюкозы совпадает с описанным выше для анаэробного гликолиза на всем протяжении, за исключением этапа, катализируемого лактатдегидрогеназой. В дрожжевых клетках, которые не содержат фермента, аналогичного лактатдегидрогеназе мышечной ткани, этот этап заменен двумя другими реакциями (рис. 15-17). В первой из них продукт расщепления глюкозы пируват теряет свою карбоксильную группу под действием *пируватдекарбоксилазы*. Эта реакция представляет собой простое декарбоксилирование; реального окисления пирувата при этом не происходит;

Рис. 15-17. Конечные этапы спиртового брожения.

В клетке эта реакция необратима. Для проявления каталитической активности пируватдекарбоксилазе требуется Mg^{2+}. С молекулой этого фермента прочно связан кофермент *тиаминпирофосфат* (о его функции в качестве переносчика ацетальдегидных групп мы уже говорили в разд. 10.4).

На последнем этапе спиртового брожения ацетальдегид восстанавливается до этанола за счет NADH, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата; эта реакция катализируется алкогольдегидрогеназой:

$$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}H + NADH + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Этанол}}{CH_3{-}CH_2OH} + NAD^+$$

Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO_2, а не лактат. Суммарное уравнение спиртового брожения имеет вид

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\text{Этанол} + 2CO_2 + 2ATP + $$
$$+ 2H_2O.$$

Отметим, что суммарное отношение атомов водорода к атомам углерода не изменяется, когда молекула D-глюкозы ($H/C = 12/6 = 2$) сбраживается до двух молекул этанола и двух молекул CO_2 ($H/C = 12/6 = 2$). И вообще при всех анаэробных брожениях отношение H/C в исходных веществах и в продуктах оказывается одинаковым.

Пируватдекарбоксилаза содержится в клетках пивных дрожжей и других микроорганизмов, осуществляющих спиртовое брожение. В животных тканях этот фермент отсутствует. Лишены пируватдекарбоксилазы также организмы, осуществляющие молочнокислое брожение, например молочнокислые бактерии.

Биохимия спиртового брожения лишь недавно изучена настолько хорошо, чтобы можно было представить этот процесс в виде ряда последовательных ферментативных реакций. Что же касается виноделия и пивоварения, то это весьма древние искусства, освоенные людьми за сотни лет до того, как родилась сама наука химия. Более того, сами старинные рецепты приготовления пива и вина сыграли в свое время важную роль, послужив ключом к некоторым фундаментальным открытиям на заре развития биологии и биохимии. Так, в 1856 г. Луи Пастер впервые убедительно показал, что сбраживание сахара в спирт вызывается микроорганизмами, а не какими-то магическими влияниями. Французские виноделы пригласили Пастера для того, чтобы он помог им выяснить, почему в иные годы вино не удается и превращается в уксус. Пастер в своих экспериментах, ставших классическими, показал, что в стерильных растворах глюкозы брожения не происходит, тогда как в растворах, соприкасающихся с непрофильтрованным воздухом, брожение идет, и причина этого заключается в том, что в раствор попадают из воздуха споры дрожжей и других микроорганизмов. Из налета на гроздьях свежесрезанного винограда Пастер выделил культуры дрожжей и доказал, что именно дрожжи ответственны за брожение, происходящее в соке, отжатом из раздавленного винограда. Он выяснил также, что превращение спирта в уксусную кислоту вызывается другими видами микроорганизмов–уксуснокислыми бактериями; эти аэробные организмы окисляют этанол с образованием уксусной кислоты. При пивоварении, которое также принадлежит к числу древнейших искусств, помимо реакций спиртового брожения протекает еще и ряд других ферментативных процессов (дополнение 15-2).

Дополнение 15-2. Пивоварение

Пиво изготовляется спиртовым брожением углеводов, содержащихся в зерне (обычно для пива берут ячмень). Эти углеводы, представлены главным образом полисахаридами и недоступны действию гли-

колитических ферментов дрожжей, сбраживающих только дисахариды и моносахариды. Поэтому из ячменя сначала готовят *солод*. Для этого ячмень проращивают, чтобы в семенах образовались ферменты, необходимые для расщепления полисахаридов клеточных стенок, а также крахмала и прочих запасных полисахаридов. В определенный момент дальнейшее проращивание подавляют нагреванием. Полученный таким путем продукт, солод, содержит среди прочих ферментов α-амилазу и мальтазу, которые расщепляют крахмал до мальтозы, глюкозы и других простых сахаров. Присутствуют в солоде также ферменты, специфически расщепляющие β-связи целлюлозы и других полисахаридов клеточных стенок семенных оболочек ячменя. Эти оболочки должны быть разрушены, для того чтобы α-амилаза могла подействовать на крахмал, содержащийся в зерне.

Следующий этап – это приготовление из солода пивного *сусла*, которое и служит питательной средой для дрожжевых клеток, осуществляющих спиртовое брожение. Для получения сусла солод дробят и смешивают с водой (затирают). Это дает возможность ферментам, образовавшимся в процессе приготовления солода, подействовать на полисахариды зерна и расщепить их до мальтозы, глюкозы и прочих простых сахаров, растворимых в водной среде. После завершения такого ферментативного осахаривания затор фильтруют и жидкое сусло кипятят с хмелем для ароматизации. Затем сусло охлаждают и аэрируют.

В подготовленное таким образом сусло добавляют дрожжевые клетки. В аэробном сусле дрожжи растут и размножаются очень быстро, извлекая необходимую им энергию из некоторых присутствующих в сусле сахаров. На этой стадии спирт не образуется, потому что дрожжи, располагая достаточным количеством кислорода, окисляют образовавшийся в процессе гликолиза пируват через цикл лимонной кислоты до CO_2 и H_2O. Аэробный метаболизм дрожжей обусловливает очень быстрый рост клеток, регулируется же этот метаболизм добавлением нужного количества кислорода. После исчерпания всего растворенного кислорода в чане с суслом дрожжевые клетки как факультативные анаэробы (разд. 13.1) переключаются на анаэробное использование сахаров. Начиная с этого момента дрожжи сбраживают содержащиеся в сусле сахара с образованием этанола и CO_2. Процесс брожения регулируется концентрацией образовавшегося этанола, а также величиной pH и количеством несброженного сахара. В определенный момент брожение останавливают, удаляют дрожжи, и молодое, или зеленое, пиво поступает на дображивание. Светлое пиво, которое стало теперь очень популярным, содержит меньше сахара и алкоголя, чем обычное, однако по своему аромату оно не отличается от обычных сортов.

На последних этапах процесса пивоварения регулируется количество пены, которую образует пиво и которая обусловлена присутствием в пиве растворенных белков. Обычно это свойство пива зависит от действия протеолитических ферментов, появляющихся в процессе приготовления солода. Если эти ферменты действуют на белки пива слишком долго, то пиво будет мало пениться; если же они, напротив, действуют недостаточно долго, то пиво в холодном состоянии не будет прозрачным. Иногда для получения нужного количества пены к пиву добавляют протеолитические ферменты из других источников. Важную роль в определении аромата пива играет *диметилсульфид*,

присутствующий в пиве в следовых количествах. В высокой концентрации это вещество имеет очень неприятный вкус, однако при полном его отсутствии легкое пиво кажется пресным и безвкусным. Диметилсульфид образуется под действием ферментов, появляющихся в процессе приготовления солода; концентрацию его приходится очень тщательно контролировать.

Мы видим, таким образом, что многие важные стороны процесса пивоварения еще не до конца ясны биохимику и здесь по-прежнему главную роль играет мастерство пивовара. Быть может, это и хорошо, что древнее искусство продолжает оставаться искусством!

Краткое содержание главы

Гликолиз, в ходе которого молекула D-глюкозы превращается в две молекулы пирувата, является для большинства организмов одним из центральных метаболических путей, используемых для получения химической энергии в форме ATP. При анаэробных условиях пируват в большей части животных и растительных тканей восстанавливается до лактата, а в дрожжевых клетках в процессе спиртового брожения превращается в этанол и CO_2. Суммарное уравнение для анаэробного гликолиза в мышцах и для молочнокислого брожения, вызываемого некоторыми видами микроорганизмов, имеет вид

$$\text{Глюкоза} + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\text{Лактат}^- + 2H^+ + 2ATP + 2H_2O.$$

Процесс спиртового брожения описывается суммарным уравнением

$$\text{Глюкоза} + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\text{Этанол} + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O.$$

В аэробных клетках пируват не восстанавливается до лактата (или до этанола и CO_2), а окисляется в ацетил-CoA и CO_2. Таким образом, гликолиз у многих организмов составляет обязательную первую стадию аэробного катаболизма глюкозы.

Превращение глюкозы в пируват катализируется десятью ферментами, действующими последовательно. Это превращение слагается из двух стадий. На первой из них, состоящей из пяти ферментативных реакций, D-глюкоза фосфорилируется за счет ATP и расщепляется в конечном счете на две молекулы D-глицеральдегид-3-фосфата. На второй стадии глицеральдегид-3-фосфат окисляется за счет NAD^+ и присоединяет неорганический фосфат с образованием 3-фосфоглицероилфосфата. Высокоэнергетическая фосфатная группа 3-фосфоглицероилфосфата передается затем на ADP, в результате чего образуются ATP и 3-фосфоглицерат, который претерпевает изомеризацию и превращается в 2-фосфоглицерат. Катализируемая енолазой дегидратация 2-фосфоглицерата приводит к фосфоенолпирувату, а этот последний отдает свою фосфатную группу ADP и превращается в свободный пируват. На первой стадии гликолиза используются две молекулы ATP, но на второй стадии из ADP образуются четыре молекулы ATP, так что в итоге на каждую расщепленную молекулу глюкозы образуются две молекулы ATP. В животных тканях в отсутствие кислорода NADH, образующийся при окислении глицеральдегид-3-фосфата, вновь окисляется в NAD^+, восстанавливая при этом пируват до лактата; катализирует эту реакцию лактатдегидрогеназа.

Остатки глюкозы, из которых построены гликоген и крахмал, превращаются в глюкозо-6-фосфат под действием гликоген-фосфорилазы или фосфорилазы крахмала и фосфоглюкомутазы. Другие гексозы, а именно фруктоза, манноза и галактоза также фосфорилируются и превращаются в промежуточные продукты гликолиза. Вовлечение глюкозы в процесс гликолиза при участии фермента гексокиназы регулируется

глюкозо-6-фосфатом, который играет роль отрицательного модулятора. Гликоген-фосфорилаза, катализирующая превращение глюкозных единиц гликогена в глюкозо-1-фосфат, принадлежит к числу регуляторных ферментов и существует в двух формах: более активной (фосфорилаза *a*) и менее активной (фосфорилаза *b*); стимулирующее действие на фосфорилазу *b* оказывает AMP. Роль главного регуляторного фермента в последовательности реакций гликолиза играет фосфофруктокиназа, которую ингибируют ATP и цитрат и стимулирует AMP. Вторым регуляторным пунктом гликолиза является пируваткиназная реакция. Последовательность реакций спиртового брожения идентична последовательности реакций гликолиза на всех этапах вплоть до образования пирувата, однако при спиртовом брожении пируват не восстанавливается до лактата, а декарбоксилируется с образованием ацетальдегида, который затем восстанавливается до этанола за счет NADH в реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Atkinson D.E. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation, Academic, New York, 1977. Интересная трактовка энергетики и регуляции гликолиза.

Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J. Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, 2 vols., Academic, New York, 1968. Достаточно полное собрание обзорных статей.

Fruton J.S. Molecules and Life, Wiley, New York, 1972. Книга содержит подробное описание истории изучения гликолиза.

Hochachka P. Living without Oxygen, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1980. Сравнительная биохимия и физиология анаэробного гликолиза у разных организмов.

Kalckar H.M. (ed.). Biological Phosphorylations: Development of Concepts, Prentice-Hall, Englewood Clifs, N.J., 1969. Содержит классические работы по гликолизу.

Lehninger A.L. Biochemistry, 2d ed., Worth, New York, 1975. (Имеется перевод: Ленинджер А. Биохимия.–М.: Мир, 1976.) В гл. 16 приведены подробные сведения о гликолизе.

Newsholme E.A., Start C. Regulation in Metabolism, Wiley, New York, 1973. В гл. 3 и 6 описана регуляция гликолиза.

Статьи

Coulson R.A. Anaerobic Glycolysis: The Smith and Wesson of the Heterotherms, Perspec. Biol. Med., **22**, 465–479 (1979). Очень интересный анализ сравнительной роли анаэробного гликолиза у крупных животных, в основе которого лежат экспериментальные наблюдения над аллигаторами и другими животными.

Ottaway J.H., Mowbray J. The Role of Compartmentation in the Control of Glycolysis, Curr. Topics Cell Regulation, **12**, 108–195 (1977).

Вопросы и задачи

1. *Уравнение для первой стадии гликолиза.* Напишите уравнения химического баланса для последовательности реакций, в ходе которых происходит расщепление D-глюкозы на две молекулы D-глицеральдегид-3-фосфата (первая стадия гликолиза). Для каждого уравнения укажите изменение стандартной свободной энергии. Напишите также суммарное уравнеиие первой стадии гликолиза и укажите суммарное изменение стандартной свободной энергии, соответствуюшее этой стадии.
2. *Вторая стадия гликолиза в скелетных мышцах.* В работающей скелетной мышце при анаэробных условиях глицеральдегид-3-фосфат превращается в лактат (вторая стадия гликолиза). Напишите уравнения химического баланса для последовательности реакций в этом процессе с указанием изменения стандартной свободной энергии для каждой из реакций. Напишите также суммарное уравнение для второй стадии гликолиза и укажите суммарное изменение стандартной свободной энергии для этой стадии.
3. *Обмен фруктозы в сперматозоидах.* Концентрация фруктозы в сперме человека и быка равна приблизительно 12 мМ. В сперматозоидах в результате анаэробного расщепления фруктозы образуется ATP, необходимый для движения (биений) жгутика. Главный катаболический путь от фруктозы к лактату в этих клетках ведет в обход фосфофруктокиназной реакции гликолиза; на этом пути используется фер-

мент, расщепляющий фруктозо-1-фосфат на два трехуглеродных соединения (рис. 15-8). Напишите уравнения для последовательности соответствующих химических превращений. Напишите также суммарное уравнение анаэробного катаболизма фруктозы (превращения ее в лактат) в сперматозоидах.

4. *Путь атомов углерода при брожении.* Опыт с вытеснением радиоактивной метки проводится на дрожжевом экстракте в строго анаэробных условиях, обеспечивающих спиртовое брожение. Небольшое количество меченного радиоактивным углеродом субстрата (импульсная метка) инкубируют с дрожжевым экстрактом в течение времени, достаточного для того, чтобы каждый из промежуточных продуктов данного метаболического пути успел включить метку. Затем метку «прогоняют» по всему пути, добавляя избыток немеченого субстрата. Это делают для того, чтобы предотвратить участие меченых продуктов в обратных реакциях и отвлечение их на другие метаболические пути.
   а) В каком положении обнаруживается метка в продукте брожения–этаноле, если субстратом служит глюкоза, меченная ^{14}C по положению 1? Почему?
   б) В каком положении должна находиться метка в исходной молекуле глюкозы для того, чтобы вся радиоактивность ^{14}C обнаруживалась в виде $^{14}CO_2$, выделяющейся при спиртовом брожении? Поясните свой ответ.

Задача 4

Глюкоза

5. *Соотношение между кинетическими характеристиками ферментов и их физиологическими функциями.* Концентрация глюкозы в клетках млекопитающих невелика по сравнению с ее концентрацией в плазме крови. Объясняется это тем, что поступление глюкозы в клетки регулируется, и глюкоза быстро фосфорилируется в результате реакции с АТР

$$\text{Глюкоза} + \text{ATP} \rightarrow \text{Глюкозо-6-фосфат} + \text{ADP} + H^+.$$

В организме млекопитающих эту реакцию катализируют два разных фермента, заметно различающихся по своим свойствам. В скелетных мышцах присутствует только один из них–гексокиназа. Этот фермент ингибируется глюкозо-6-фосфатом и характеризуется величиной K_M 0,1 мМ. В печени помимо гексокиназы содержится также и глюкокиназа, которая здесь преобладает. Глюкокиназа характеризуется гораздо большей величиной K_M (10,0 мМ) и не ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Какое значение имеет различие в величине K_M для гексокиназы мышц и глюкокиназы печени? Как должны сказываться различия в свойствах этих двух ферментов (величина K_M и способность ингибироваться глюкозо-6-фосфатом) на их физиологической роли в мышцах и в печени?

6. *Роль лактатдегидрогеназы.* При напряженной работе мышечная ткань потребляет гораздо больше АТР, чем в состоянии покоя. В белых скелетных мышцах, например в мышцах ног у кролика или мышцах крыла у индейки, почти весь этот АТР образуется в процессе анаэробного гликолиза. На рис. 15-5 видно, что АТР образуется на второй стадии гликолиза в ходе двух ферментативных реакций, катализируемых фосфоглицераткиназой и пируваткиназой. Представим себе, что в скелетной мышце отсутствует лактатдегидрогеназа. Могла бы мышца в этом случае напряженно работать, т.е. с большой скоростью генерировать АТР путем гликолиза? Аргументируйте свой ответ. Учтите, что лактатдегидрогеназная реакция не требует участия АТР. От ясного понимания ответа на этот вопрос зависит правильное представление о гликолитическом цикле в целом.

7. *Арсенатное отравление.* В структурном и химическом отношении арсенат сходен с фосфатом (P_i), поэтому многие ферменты, нуждающиеся в фосфате, используют также и арсенат. Однако органические производные мышьяковой кислоты менее стабильны, чем соответствующие производные фосфорной кислоты. Например, ациларсенаты легко разлагаются без участия катализаторов:

$$R{-}C({=}O){-}O{-}As({=}O)(O^-){-}O^- + H_2O \longrightarrow R{-}C({=}O){-}O^- + HOAsO_3^{2-} + H^+$$

В отличие от них ацилфосфаты, например 3-фосфоглицероилфосфат, более устойчивы и подвергаются в клетке превращениям

только под действием соответствующих ферментов.

а) Как повлияет замена фосфата арсенатом на суммарную реакцию, катализируемую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой?

б) Каковы последствия замены фосфата арсенатом? Для большинства организмов арсенат крайне токсичен. Чем это объясняется?

8. *Потребность в фосфате при спиртовом брожении.* В 1905 г. Гарден и Йонг провели ряд работ по спиртовому брожению, ставших классическими. Изучая сбраживание D-глюкозы до этанола и CO_2 под действием экстрактов пивных дрожжей, исследователи установили следующее. 1) Для сбраживания необходим неорганический фосфат; по исчерпании запаса фосфата брожение прекращается еще до того, как будет использована вся глюкоза. 2) При брожении в этих условиях накапливаются этанол, CO_2 и гексозодифосфат. 3) Если заменить фосфат на арсенат, то гексозодифосфат не накапливается, но брожение продолжается до тех пор, пока вся глюкоза не превратится в этанол и CO_2.

а) Почему при исчерпании запаса фосфата брожение прекращается?

б) Почему накапливаются этанол и CO_2? Необходимо ли превращение пирувата в этанол и CO_2? Почему? Укажите, какой гексозодифосфат накапливается. Почему он накапливается?

в) Почему замена фосфата на арсенат предотвращает накопление гексозодифосфата, но в то же время обеспечивает завершение брожения, т.е. полное превращение глюкозы в этанол и CO_2 (см. п. 7)?

9. *Обмен глицерола.* Глицерол, образующийся при расщеплении жиров, превращается в результате двух ферментативных реакций в промежуточный продукт гликолиза – дигидроксиацетонфосфат. Выскажите свои предположения о возможной последовательности реакций в процессе обмена глицерола. На каких известных ферментативных реакциях основаны ваши предположения? Напишите суммарное уравнение превращения глицерола в пируват исходя из своих представлений.

Задача 9

$$HO{-}CH_2{-}\underset{\large H}{\overset{\large OH}{C}}{-}CH_2{-}OH$$

Глицерол

10. *Измерение внутриклеточных концентраций метаболитов.* Измерение концентраций промежуточных продуктов метаболизма в живой клетке сопряжено с большими экспериментальными трудностями. Поскольку клеточные ферменты катализируют быстро протекающие метаболические превращения, одна из обычных проблем при всяком экспериментальном вмешательстве в жизнь клетки связана с тем, что данные, полученные путем измерений, отражают не физиологические, а равновесные концентрации метаболитов. Поэтому любая экспериментальная методика будет надежной лишь в том случае, если с ее помощью удастся мгновенно подавить все ферментативные реакции в интактной ткани и тем самым предотвратить дальнейшие превращения промежуточных продуктов метаболизма. Этой цели можно достичь путем быстрого сжатия ткани между большими алюминиевыми пластинами, охлажденными жидким азотом (–190°C); такой прием носит название «фиксация замораживанием». После замораживания, мгновенно подавляющего действие ферментов, ткань растирают в порошок и ферменты инактивируют путем осаждения хлорной кислотой. Осадок удаляют центрифугированием, а прозрачную надосадочную жидкость анализируют на содержание в ней метаболитов с помощью специфических ферментативных тестов. Истинную концентрацию данного метаболита в клетке определяют расчетным путем, учитывая общее содержание воды в ткани и данные измерений объема внеклеточного пространства. В табл. 1 приведены кажущиеся внутриклеточные концентрации субстратов и продуктов реакции фосфорилирования фруктозо-6-фосфата, катализируемой фер-

Таблица 1[1)]

Метаболит	Кажущаяся концентрация, мМ (мкмоль/мл внутриклеточной H_2O)
Фруктозо-6-фосфат	0,087
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,022
ATP	11,52
ADP	1,32

[1)] По Williamson, J. Biol. Chem., 240, 2308, 1965.

ментом фосфофруктокиназой в изолированной ткани сердца крысы.

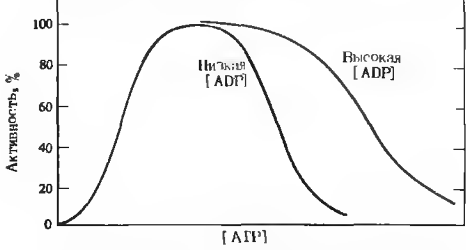
а) По данным табл. 1 вычислите отношение действующих масс Q для фосфофруктокиназной реакции при физиологических условиях

$$Q = \frac{[\text{Фруктозо-1,6-дифосфат}]\,[\text{ADP}]}{[\text{Фруктозо-6-фосфат}]\,[\text{ATP}]}.$$

б) Величина $\Delta G^{0\prime}$ для фсфофруктокиназной реакции равна $-3{,}4$ ккал/моль. Исходя из этого вычислите константу равновесия для этой реакции.

в) Сравните величины Q и K'_{eq}. Находится ли данная физиологическая реакция в состоянии равновесия? Что говорит этот эксперимент о роли фосфофруктокиназы в качестве регуляторного фермента?

11. *Регуляция фосфофруктокиназы.* Приведенный на рисунке график описывает зависимость между концентрацией ATP и активностью фосфофруктокиназы, которая представляет собой аллостерический фермент. При данной концентрации фруктозо-6-фосфата активность фосфофруктокиназы с повышением концентрации ATP сначала возрастает, но в какой-то момент наступает перелом–дальнейшее повышение концеитрации ATP вызывает уже ингибирование фермента.



а) Объясните, как может ATP быть и субстратом, и ингибитором фосфофруктокиназы. Как регулируется активность этого фермента с помощью ATP?

б) Каким образом регулируется гликолиз в зависимости от уровня ATP?

в) Ингибирующее действие ATP на фосфофруктокиназу проявляется слабее при высокой концентрации ADP. Как можно объяснить этот факт?

12. *Ферментативная активность и физиологическая функция.* Гликоген-фосфорилаза из скелетных мышц характеризуется гораздо более высокой величиной V_{max}, чем тот же фермент из ткани печени.

а) Какую физиологическую функцию выполняет гликоген-фосфорилаза в скелетной мышце и в ткани печени?

б) Почему величина V_{max} для мышечного фермента должна быть больше, чем для фермента из печени?

13. *Ферментная недостаточность при углеводном обмене.* Ниже описаны четыре клинических случая. Назовите для каждого случая дефектный фермент и дайте соответствующие рекомеидации, выбрав их из приложенного перечня. Укажите, на чем основано ваше решение. Ответьте на вопросы, приведенные в описании каждого из четырех случаев.

Случай 1. Больной не переиосит молока. Как только он его выпьет, у него сразу же начинаются рвота и понос. Проведен тест на толерантность к лактозе. (Испытуемый получает при этом определенное количество лактозы, после чего у него через соответствующие промежутки времени измеряют концентрацию глюкозы и галактозы в плазме крови. В норме уровень этих сахаров возрастает до максимума примерно через час, а затем снижается.) У больного в этом тесте концентрация глюкозы и галактозы в крови не возрастала, а оставалась постоянной. Объясните, почему у здоровых людей концентрация глюкозы и галактозы в крови сначала растет, а затем снижается. Почему у больного таких изменений ие происходит?

Случай 2. У больного с умственной отсталостью молоко вызывает рвоту и понос. В крови концентрация глюкозы низка, а концентрация редуцирующих сахаров значительно выше нормы. В моче обнаруживается галактоза. Чем объясняется высокая концентрация редуцирующих сахаров в крови? Почему в моче обнаруживается галактоза?

Случай 3. Больной страдает от судорог в мышцах при напряженной физической работе, но в остальном чувствует себя здоровым. Биопсия мышечной ткани выявила, что концентрация гликогена в мышцах этого больного гораздо выше нормы. Почему накапливается гликоген?

Случай 4. Больная вялая, апатичная. Печень увеличена; при биопсии печени обнаружен большой избыток гликогена. Концентрация глюкозы в крови ниже нормы. В чем причина пониженной концентрации глюкозы в крови этой больной?

Ферменты, активность которых нарушена	*Рекомендации*
а) Фосфофруктокиназа мышц	1. Бег трусцой по 5 км/день
б) Фосфоманноизомераза	2. Обезжиренная диета
в) Галактозо-1-фосфатуридилилтрансфераза	3. Диета с низким содержанием лактозы
г) Фосфорилаза печени	4. Запрещается тяжелая физическая работа
д) Триозокиназа	5. Большие дозы ниацина
е) Лактаза в слизистой кишечника	6. Частое и регулярное питание
ж) Мальтаза в слизистой кишечника	

14. *Тяжесть клинических симптомов, обусловленных ферментной недостаточностью.* Клинические симптомы двух форм галактоземии, одна из которых обусловлена недостаточностью галактокиназы, а другая – галактозо-1-фосфат – уридилилтрансферазы, резко различаются по своей тяжести. И в том и в другом случае молоко вызывает у больных кишечные расстройства, но при недостаточности галактозо-1-фосфат – уридилилтрансферазы нарушаются также функции печени, почек, селезенки и мозга, а затем наступает смерть. Какие продукты накапливаются в крови и в тканях при недостаточности каждого из этих двух ферментов? Оцените сравнительную токсичность этих продуктов на основе приведенных выше данных.

ГЛАВА 16

ЦИКЛ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

В предыдущей главе мы познакомились с тем, как энергия, извлекаемая при расщеплении глюкозы в отсутствие кислорода, запасается в форме АТР. Однако почти все животные и растительные клетки в норме аэробны и свое органическое «топливо» окисляют полностью до двуокиси углерода и воды. В этих условиях пируват, образующийся при расщеплении глюкозы, не восстанавливается до лактата или до этанола и CO_2, как в анаэробных условиях. Вместо этого он окисляется до CO_2 и H_2O в аэробной стадии катаболизма, которую биохимики называют *дыханием*. Говоря о дыхании, мы обычно имеем в виду его физиологический или макроскопический аспект, т. е. подразумеваем под этим термином процесс поглощения O_2 и выделения CO_2 в легких. Биохимики же и цитологи вкладывают в этот термин другой смысл: они рассматривают дыхание на микроскопическом уровне, т. е. интересуются молекулярными механизмами процессов потребления O_2 и образования CO_2 в клетках.

В клеточном дыхании различают три главные стадии (они показаны на рис. 16-1). На первой стадии органические соединения, играющие роль клеточного топлива, т. е. углеводы, жирные кислоты и некоторые аминокислоты, окисляются до двухуглеродных фрагментов – ацетильных групп, входящих в со-

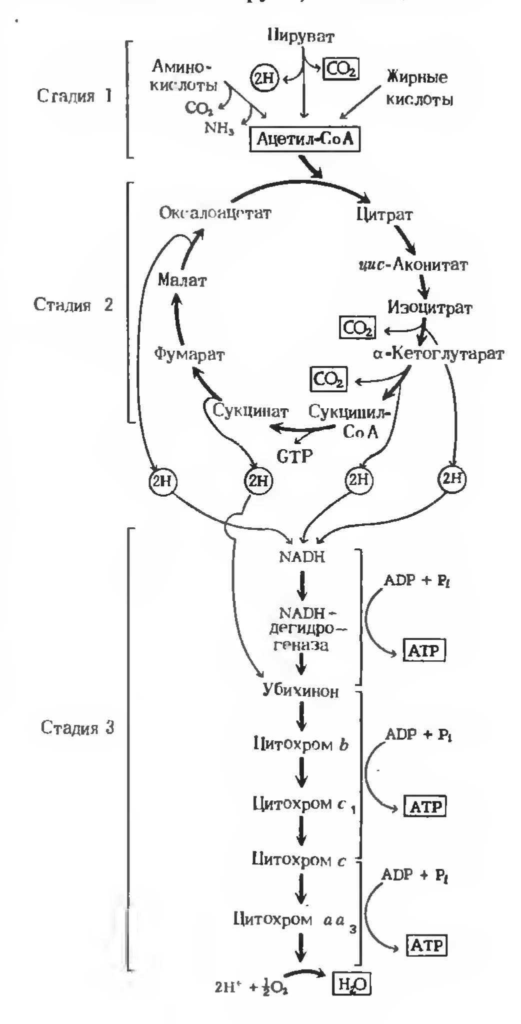


Рис. 16-1. Стадии клеточного дыхания. *Стадия 1:* мобилизация ацетил-СоА из глюкозы, жирных кислот и некоторых аминокислот. *Стадия 2:* цикл лимонной кислоты. *Стадия 3:* перенос электронов и окислительное фосфорилирование. На каждую пару атомов водорода, поступающую в цепь переноса электронов в виде NADH, образуются три молекулы АТР.

став ацетилкофермента А. На второй стадии эти ацетильные группы включаются в цикл лимонной кислоты, в котором они ферментативным путем расщепляются с образованием высокоэнергетических атомов водорода и высвобождением CO_2, которая представляет собой конечный продукт окисления органического топлива. На третьей стадии атомы водорода разделяются на протоны (H^+) и богатые энергией электроны, которые передаются по цепи переносчиков электронов, или *дыхательной цепи*, на молекулярный кислород и восстанавливают его в H_2O. *Перенос электронов* сопровождается выделением большого количества энергии, запасаемой в форме АТР в процессе, получившем название *окислительного фосфорилирования*. Дыхание – процесс гораздо более сложный, чем гликолиз; было удачно сказано, что дыхание относится к гликолизу так, как современная реактивная турбина к одноцилиндровому поршневому двигателю.

В этой главе мы рассмотрим открытый Кребсом *цикл лимонной кислоты*, называемый также *циклом трикарбоновых кислот*. Это общий конечный путь для окисления ацетильных групп, в которые превращается в процессе катаболизма большая часть органических молекул, играющих роль клеточного топлива – углеводов, жирных кислот и аминокислот.

16.1. При окислении глюкозы до CO_2 и H_2O высвобождается значительно больше энергии, чем при гликолизе

Выше (дополнение 15-1) мы говорили о том, что при расщеплении глюкозы до лактата в процессе гликолиза высвобождается лишь очень небольшая часть химической энергии, которая потенциально может быть извлечена из молекулы глюкозы. Гораздо больше энергии извлекается, когда молекула глюкозы окисляется полностью до CO_2 и H_2O, в чем можно убедиться, сравнив величины изменения стандартной свободной энергии для этих двух реакций:

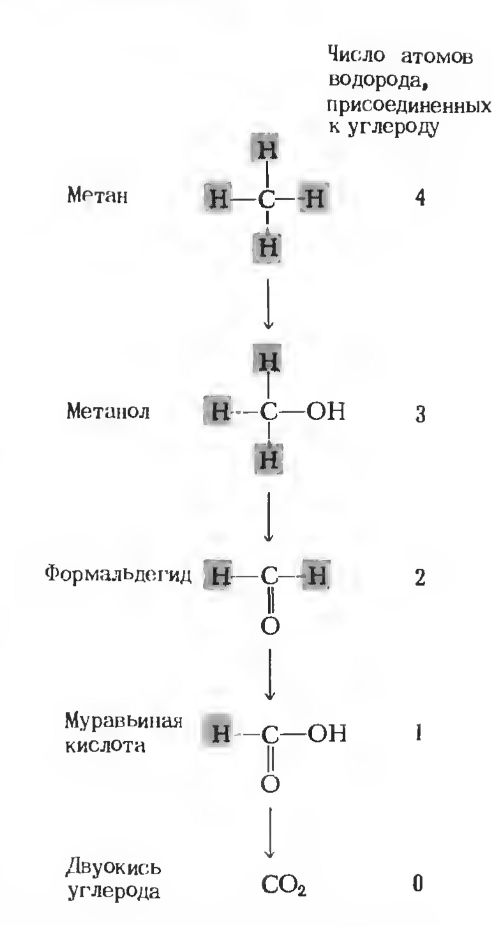


Рис. 16-2. Последовательные этапы окисления метана до CO_2. По мере того как четыре атома водорода один за другим отщепляются от углерода, скачкообразно снижается и количество доступной свободной энергии. В простых органических соединениях отношение числа связанных с углеродом атомов водорода к числу атомов углерода приблизительно пропорционально стандартной свободной энергии окисления данного соединения до CO_2.

$$\text{Глюкоза} \rightarrow 2\text{Лактат} + 2H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -47{,}0 \text{ ккал/моль},$$

$$\text{Глюкоза} + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -686 \text{ ккал/моль}.$$

Когда в клетках расщепление глюкозы протекает анаэробно, продукт этого расщепления, лактат, содержит в себе приблизительно 93% той энергии, которая была заключена в исходной молекуле глюкозы. Объясняется это тем, что молочная кислота – соединение почти столь

же сложное, как глюкоза, а также тем, что реального окисления при гликолизе не происходит. Количество свободной энергии, выделяющееся при полном сгорании какого-нибудь органического соединения, приблизительно пропорционально величине отношения между числом атомов водорода, связанных с углеродом, и общим числом углеродных атомов, как это видно из очень простого примера, приведенного на рис. 16-2. Вся биологически доступная свободная энергия высвобождается из глюкозы или из другого органического топлива лишь в том случае, если все водородные атомы, связанные с атомами углерода данной молекулы, будут удалены и заменены кислородом с образованием CO_2.

16.2. Пируват должен сначала окислиться до ацетил-СоА и CO_2

Углеводы, жирные кислоты и большинство аминокислот окисляются в конечном счете через цикл лимонной кислоты до CO_2 и H_2O. Однако, прежде чем эти питательные вещества будут вовлечены в цикл, их углеродный скелет должен быть разрушен, а его фрагменты должны превратиться в ацетильные группы ацетил-СоА, потому что именно в этой форме цикл лимонной кислоты принимает бóльшую часть поступающего в него «топлива». О том, как из жирных кислот и аминокислот образуются ацетильные группы для этого цикла, мы узнаем из гл. 18 и 19. Здесь же мы рассмотрим процесс, в результате которого пируват, образовавшийся при гидролитическом расщеплении глюкозы, окисляется до ацетил-СоА и CO_2 при участии набора ферментов, объединенных структурно в так называемый *пируватдегидрогеназный комплекс*. Эта мультиферментная система, находящаяся у эукариотических клеток в митохондриях, а у прокариотических – в цитоплазме, катализирует следующую суммарную реакцию:

$$\text{Пируват} + NAD^+ + \text{CoA-SH} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Ацетил-CoA} + NADH + CO_2$$
$$\Delta G^{0\prime} = -8{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

В ходе этой довольно сложной реакции происходит *окислительное декарбоксилирование* пирувата – процесс дегидрирования, в результате которого карбоксильная группа пирувата удаляется в виде молекулы CO_2, а его ацетильная группа включается в состав ацетил-СоА. Один атом водорода, отщепляемый от пирувата, обнаруживается в составе NADH, а другой – в виде H^+. Затем образовавшийся таким путем NADH передает свои электроны в цепь переноса электронов (рис. 16-1), по которой они в конечном счете передаются на молекулярный кислород.

В объединенном процессе дегидрирования и декарбоксилирования пирувата до ацетил-СоА участвуют последовательно три разных фермента: *пируватдегидрогеназа* (E_1), *дигидролипоил-ацетилтрансфераза* (E_2) и *дигидролипоилдегидрогеназа* (E_3), а также пять коферментов, или простетических групп – *тиаминпирофосфат* (TPP), *флавинадениндинуклеотид* (FAD), *кофермент А* (СоА), *никотинамидадениндинуклеотид* (NAD^+) и *липоевая кислота*. Все эти ферменты и коферменты объединены в мультиферментную систему, которую впервые выделили и подробно исследовали Лестер Рид с сотрудниками из Техасского университета. Четыре витамина из числа тех, в которых нуждается организм человека, являются необходимыми компонентами именно этой системы. Эти витамины: тиамин (в TPP), рибофлавин (в FAD), пантотеновая кислота (в СоА) и никотинамид (в NAD^+). Кроме того, для реакции требуется еще и *липоевая кислота* (рис. 16-3); она играет роль необходимого витамина, или фактора роста у некоторых микроорганизмов, тогда как высшие животные способны ее синтезировать из легко доступных предшественников. Пируватдегидрогеназный комплекс, выделенный из клеток *E. coli*, представляет собой частицу диаметром около 45 нм, т. е. несколько большую по своим размерам, чем рибосома. Молекулярная масса этой крупной мультиферментной системы превышает $6 \cdot 10^6$. В центре комплекса, составляя как бы его «ядро», к которому прикрепляются другие ферменты, распо-

лагается дигидролипоил-ацетилтрансфераза (мол. масса 200 000). Ее молекула состоит из 24 субъединиц – полипептидных цепей, в каждой из которых к двум специфическим остаткам лизина в активном центре субъединицы присоединены две липоильные группы (присоединение происходит путем образования пептидной связи между карбоксильной группой липоевой кислоты и ε-аминогруппой остатка лизина; рис. 16-3). К дигидролипоил-ацетилтрансферазе присоединены очень крупные молекулы пируватдегидрогеназы и дигидролипоилдегидрогеназы. Пируватдегидрогеназа содержит связанный тиаминпирофосфат, а дигидролипоилдегидрогеназа – связанный FAD. Липоиллизиновые группы центрального фермента пируватдегидрогеназного комплекса, имеющие длину около 1,4 нм, функционируют как «поворотные кронштейны», переносящие атомы водорода и ацетильные группы от одной ферментной молекулы комплекса к другой. К пируватдегидрогеназному комплексу присоединены еще и два других фермента, регулирующие пируватдегидрогеназную реакцию (о них будет сказано ниже).

На рис. 16-4 представлена в схематическом виде катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом последовательность реакций, в ходе которых осуществляется декарбоксилирование и дегидрирование пирувата. Эта последовательность включает пять стадий. На стадии 1 пируват теряет свою карбоксильную группу в результате взаимодействия с тиаминпирофосфатом, присоединенным к пируватдегидрогеназе (E_1); в результате этой реакции образуется гидроксиэтильное производное тиаминпирофосфата с гидроксиэтильной группой при тиазольном кольце (разд. 10.4). Пируватдегидрогеназа катализирует также стадию 2 – перенос атомов водорода и ацетильной группы от тиаминпирофосфата на окисленную форму липоиллизиновых простетических групп центрального фермента комплекса, дигидролипоил-ацетилтрансферазы, с образованием 6-ацетилтиоэфира восстановленных липоильных групп. На стадии 3 молекула CoA-SH взаимодействует с ацетильным производным дигидролипоил-ацетилтрансферазы, что приводит к образованию ацетил-S-CoA и к полностью восстановленной, или дитиоловой, форме липоильных групп. На стадии 4 на эту восстановленную форму дигидролипоил-ацетилтрансферазы воздействует дигидролипоилдегидрогеназа, катализирующая перенос атомов водорода от восстановленных липоильных групп на FAD, который играет роль простетической группы дигидролипоилдегидрогеназы. На стадии 5 (заключительной в этой по-

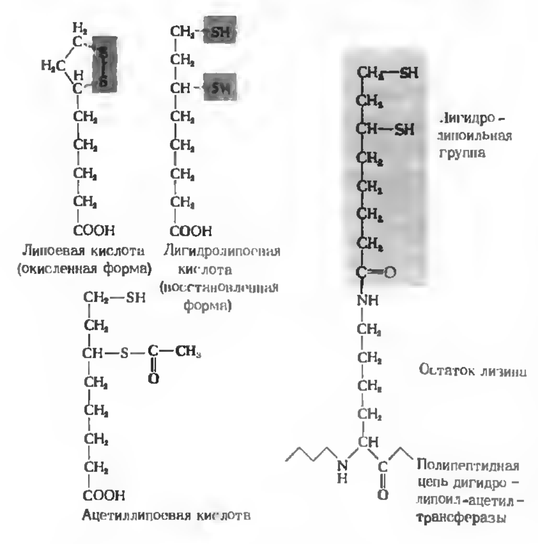


Рис. 16-3. Липоевая кислота и ее активная форма, представляющая собой простетическую группу дигидролипоил-ацетилтрансферазы. Липоевая кислота и липоильная группа могут существовать в окисленной (дисульфидной), восстановленной (дитиоловой) и ацетилированной формах. Поэтому липоильная группа действует и как переносчик водорода, и как переносчик ацетильных групп. Липоиллизиновая группа, имеющая длину около 1,4 нм, действует как «поворотный кронштейн». Она переносит атомы водорода от пируватдегидрогеназы на дигидролипоилдегидрогеназу, а также ацетильную группу на CoA-SH.

Липоевую кислоту называют иногда псевдовитамином.

Стадия

1. $$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COO^- + H^+ + (E_1){-}TPP \longrightarrow (E_1){-}TPP{-}CHOH{-}CH_3 + CO_2$$

2. $$(E_1){-}TPP{-}CHOH{-}CH_3 + (E_2){-}\text{[цикл } S{-}S\text{]} \longrightarrow (E_1){-}TPP + (E_2){-}\text{[}S{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_3\text{, } SH\text{]}$$

3. $$(E_2){-}\text{[}S{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_3\text{, } SH\text{]} + CoA\text{-}SH \longrightarrow (E_2){-}\text{[}SH\text{, } SH\text{]} + CoA{-}S{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_3$$

4. $$(E_2){-}\text{[}SH\text{, } SH\text{]} + (E_3){-}FAD \longrightarrow (E_2){-}\text{[цикл } S{-}S\text{]} + (E_3){-}FADH_2$$

5. $$(E_3){-}FADH_2 + NAD^+ \longrightarrow (E_3){-}FAD + NADH + H^+$$

Суммарная реакция

$$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COO^- + CoA\text{-}SH + NAD^+ \longrightarrow CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}S{-}CoA + CO_2 + NADH$$

Рис. 16-4. Стадии окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-СоА – процесса, катализируемого пируватдегидрогеназным комплексом. Для того чтобы можно было легче проследить судьбу пирувата, его превращения выделены красным цветом. Структура тиаминпирофосфата и его α-гидроксиэтильного производного показана на рис. 10-2. E_1 – пируватдегидрогеназа; TPP – тиаминпирофосфат; TPP–CHOH–CH_3–α-гидроксиэтилтиаминпирофосфат; E_2-дигидролипоил-ацетилтрансфераза; E_3 – дигидролипоилдегидрогеназа.

следовательности реакций) восстановленная FAD-группа дигидролипоилдегидрогеназы передает водород на NAD^+ с образованием NADH. Важнейшую роль в рассматриваемом процессе играют липоиллизиновые боковые группы дигидролипоил-ацетилтрансферазы, передающие от одного фермента к другому атомы водорода и ацетильную группу. Все эти ферменты и коферменты структурно организованы в единый комплекс, благодаря чему простетические группы сближены и промежуточные продукты реакции быстро взаимодействуют друг с другом. Если бы эти очень крупные ферментные молекулы были разобщены и свободно перемещались в цитозоле, то им пришлось бы в процессе диффузии преодолевать немалые расстояния, прежде чем они могли бы столкнуться и вступить во взаимодействие. На рис. 16-5 приведена электронная микрофотография пируватдегидрогеназного комплекса.

Недостаток витамина B_1, или тиамина (разд. 10.4), обусловливает заболевание, известное под названием *бери-бери*. Теперь нам ясно, что в организме животных, лишенных тиамина, оказывается невозможным нормальное окисление пирувата. Особенно сильно влияет такое нарушение на мозг, который обычно получает всю необходимую энергию путем аэробного окисления глюкозы и для которого поэтому окисление пирувата – жизненно необходимый процесс. Характерный для бери-бери полиневрит



Рис. 16-5. Электронная микрофотография пируватдегидрогеназного комплекса, выделенного из клеток *E. coli*. Видно, что частицы комплекса состоят из субъединиц.

и общее нарушение функций двигательной нервной системы (гл. 10) обусловлены нарушением функции пируватдегидрогеназы.

Важно отметить, что процесс, катализируемый пируватдегидрогеназным комплексом, в животных тканях необратим. Это подтверждено изотопным методом, при помощи которого было показано, что радиоактивная CO_2 не присоединялась вновь к ацетил-CoA, т.е. образования пирувата, меченного по карбоксильной группе, не происходило.

Ниже мы увидим, что регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса составляет один из важных элементов в биологическом контроле дыхания.

16.3. Цикл лимонной кислоты – это не линейный, а замкнутый путь

Теперь, когда мы знаем, каким образом из пирувата образуется ацетил-CoA, мы можем считать себя достаточно подготовленными и к рассмотрению цикла лимонной кислоты. Для начала целесообразно попытаться получить о нем некое общее предствление. Гликолиз включает *линейную* последовательность ферментативных реакций, тогда как ферментная система, осуществляющая цикл лимонной кислоты, работает иначе, в циклическом режиме. Цикл (рис. 16-6) начинается с того, что ацетил-CoA отдает свою ацетильную группу четырехуглеродному соединению – *оксалоацетату*, в результате чего образуется шестиуглеродное соединение – *цитрат*. Затем цитрат превращается в *изоцитрат*, также шестиуглеродное соединение, которое дегидрируется с утратой CO_2 и превращается таким путем в пятиуглеродное соединение – α-кетоглутарат. От α-кетоглутарата отщепляется CO_2 (вторая по счету молекула двуокиси углерода), и появляется четырехуглеродное соединение – *сукцинат*. Из сукцината в результате трех ферментативных реакций образуется четырехуглеродный *оксалоацетат*, с которого и начался цикл. Каждый оборот цикла сопровождается, таким образом, регенерацией оксалоацетата; образовавшийся оксалоацетат может теперь вступить во взаимодействие с новой молекулой ацетил-CoA, т.е. начать новый оборот цикла. В каждый оборот цикла вступает – в форме ацетил-CoA – одна ацетильная группа (два атома углерода), и при каждом обороте из цикла выводятся две молекулы

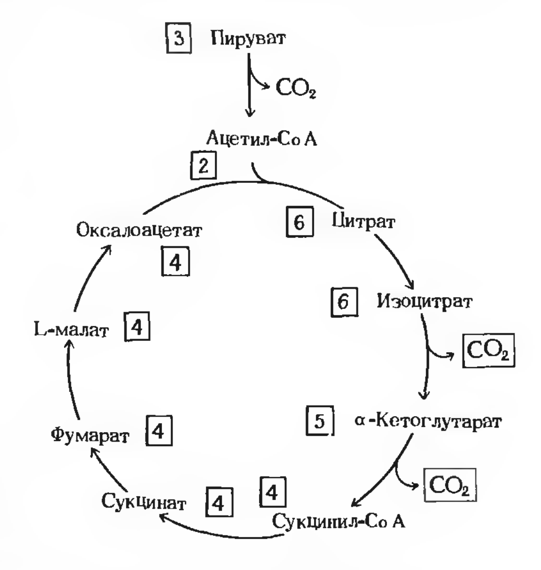


Рис. 16-6. Схема цикла лимонной кислоты. В красных рамках указано число атомов углерода в соответствующих промежуточных продуктах. Четыре атома углерода сукцинил-CoA содержатся в сукцинильной группе, т.е. в той части молекулы, из которой образуется свободный сукцинат.

CO_2. На образование цитрата в каждом обороте цикла расходуется одна молекула оксалоацетата, однако в результате ряда реакций этот оксалоацетат регенерирует. Таким образом, в цикле лимонной кислоты оксалоацетат не расходуется. Теоретически одной молекулы оксалоацетата может оказаться достаточно для окисления любого числа ацетильных групп.

16.4. Как родилась сама мысль о существовании цикла лимонной кислоты?

Это законный вопрос, поскольку подобный цикл – с окислением двухуглеродных ацетильных групп до CO_2 через шестиуглеродную лимонную кислоту – может показаться излишне сложным и, следовательно, противоречащим принципу максимальной экономии, заложенному в биохимическую логику живой клетки.

Впервые предположение о существовании такого цикла для окисления пирувата в животных тканях было высказано в 1937 г. Гансом Кребсом. Эта идея родилась у него, когда он исследовал влияние анионов различных органических кислот на скорость поглощения кислорода суспензиями измельченных грудных мышц голубя, в которых происходило окисление пирувата. Грудные мышцы отличаются чрезвычайно высокой интенсивностью дыхания, что делает их особенно удобным объектом для изучения окислительной активности. Незадолго до описываемых работ Кребса Альберт Сент-Дьёрдьи в Венгрии обнаружил, что некоторые четырехуглеродные дикарбоновые органические кислоты, присутствующие в животных тканях (*янтарная*, *фумаровая*, *яблочная* и *щавелевоуксусная*), способны усиливать поглощение кислорода мышечной тканью. Кребс подтвердил это наблюдение и показал, что перечисленные органические кислоты стимулируют также окисление пирувата. Кроме того, он нашел, что окисление пирувата мышечной тканью стимулируется шестиуглеродными трикарбоновыми кислотами – *лимонной*, *цис-аконитовой*

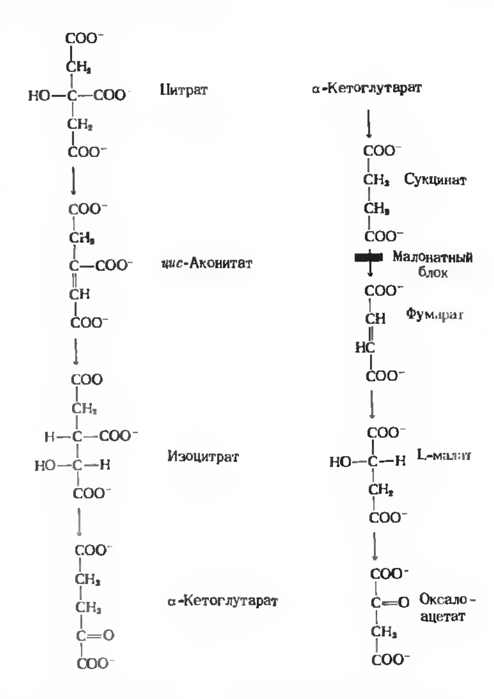


Рис. 16-7. Природные трикарбоновые и дикарбоновые кислоты, способные стимулировать окисление пирувата в суспензиях мышечной ткани. Другие встречающиеся в природе органические кислоты, например виинокаменная, щавелевая и кетоадипиновая, такой способностью не обладают. Активные кислоты приведены здесь в той последовательности, в какой они появляются в цикле лимонной кислоты. На каждом этапе происходит только одно химическое изменение. Отмечен этап, ингибируемый малонатом: в присутствии малоната цитрат окисляется до сукцината, который накапливается.

и *изолимонной*, а также пятиуглеродной α-кетоглутаровой кислотой. Структура всех этих кислот представлена на рис. 16-7. Испытаны были и некоторые другие встречающиеся в природе органические кислоты, но ни одна из них не обнаружила подобной активности. Обращал на себя внимание сам характер стимулирующего действия активных кислот: даже малого количества любой из них было достаточно для того, чтобы вызвать окисление во много раз большего количества пирувата.

Другое важное наблюдение Кребса касалось действия *малоната* (рис. 16-8), одного из конкурентных ингибиторов сукцинатдегидрогеназы (разд. 9.13). Вы-

яснилось, что малонат ингибирует аэробное потребление пирувата суспензиями измельченной мышечной ткани независимо от того, какая из активных кислот добавлена к суспензии. Это свидетельствовало о том, что сукцинат и сукцинатдегидрогеназа составляют необходимое звено в цепи ферментативных реакций, из которых слагается окисление пирувата. Кребс нашел далее, что если ингибировать малонатом аэробное потребление пирувата суспензией мышечной ткани, то в суспендирующей среде будут накапливаться цитрат, α-кетоглутарат и сукцинат. Отсюда следовало, что в норме, т.е. в отсутствие малоната, цитрат и α-кетоглутарат превращаются в сукцинат.

Малонат	Сукцинат
COO^- — CH_2 — COO	COO — CH_2 — CH_2 — COO

Рис. 16-8. Малонат – один из конкурентных ингибиторов сукцинатдегидрогеназы (см. также рис. 19-12). Обратите внимание на сходство структуры малоната и сукцината.

Исходя из этих основных данных и из некоторых других наблюдений, Кребс пришел к выводу, что все перечисленные выше активные три- и дикарбоновые кислоты можно расположить в некой логической химической последовательности, каждый этап которой представляет собой простое химическое превращение, катализируемое одним специфичным ферментом (рис. 16-7). Далее, поскольку инкубация пирувата и оксалоацетата с измельченной мышечной тканью приводила к накоплению цитрата в среде, Кребс сделал вывод, что эта последовательность является не линейной, а циклической, т.е. что ее начало смыкается с ее концом (рис. 16-9). Недостающим звеном, замыкающим цикл, должна была служить реакция

$$\text{Пируват} + \text{Оксалоацетат} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Цитрат} + CO_2.$$

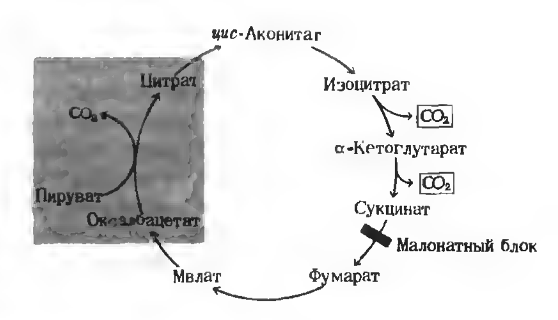


Рис. 16-9. Замыкание цикла в первой из предложенных схем. Когда Кребс обнаружил, что пируват и оксалоацетат взаимодействуют с образованием цитрата (реакции на красном фоне), то стало ясно, что последовательность реакций имеет циклический характер. Обратите внимание, что сукцинат накапливается при малонатном блоке, когда пируват и оксалоацетат окисляются через цитрат.

Описанные выше простые эксперименты, а также логические рассуждения позволили Кребсу высказать предположение, что цикл, который он назвал *циклом лимонной кислоты*, является главным путем окисления углеводов в мыщце. За годы, прошедшие со времени открытия этого цикла, выяснилось, что он существует не только в мышцах. Цикл лимонной кислоты обнаружен практически во всех тканях высших животных и растений и у многих аэробных микроорганизмов. За это важное открытие Кребс был удостоен в 1953 г. Нобелевской премии, которую он разделил с Фрицем Липманом, «отцом» АТР-цикла (разд. 14.7).

Цикл лимонной кислоты называют также *циклом трикарбоновых кислот* Это второе название появилось в связи с тем, что в течение нескольких лет после того, как Кребс постулировал существование цикла, не было полной уверенности в том, какая именно из трикарбоновых кислот (лимонная или, например, изолимонная) является первым продуктом конденсации пирувата с оксалоацетатом. Эта неопределенность, как мы увидим ниже, теперь устранена. В настоящее время точно известно, что первой из трикарбоновых кислот образуется именно лимонная кислота. Поэтому лучше всего называть данный метаболический путь



Рис. 16-10. Фотография сэра Ганса Кребса, сделанная по случаю его восьмидесятилетия в августе 1980 г. Кребс родился в Германии и там же получил медицинское образование. С 1926 по 1930 г. работал в Берлине с Отто Варбургом, который сам был одним из основоположников современной биохимии. В 1932 г., выполняя обязанности ассистента на медицинском факультете Фрейбургского университета, Кребс совместно с одним из студентов факультета Куртом Хенсейлайтом разработал схему постулированного ими цикла мочевины (гл. 19). В 1933 г. Кребс эмигрировал в Англию и начал работать в Кембриджском университете. Позже он перешел в Шеффилдский университет, где им и была выполнена бóльшая часть работ по циклу лимонной кислоты. В 1954 г. он возглавил биохимический факультет в Оксфорде. После ухода с этого поста в 1967 г. Кребс вновь целиком посвятил себя исследовательской работе на медицинском факультете в Оксфорде. Он занялся изучением динамики и регуляции метаболизма и работал здесь очень активно вместе с несколькими сотрудниками вплоть до своей смерти в ноябре 1981 г. Кребс часто выступал с лекциями в университетах всего мира, и лекции его пользовались большой популярностью. Открытие цикла лимонной кислоты считается одним из важнейших в истории биохимии метаболизма.

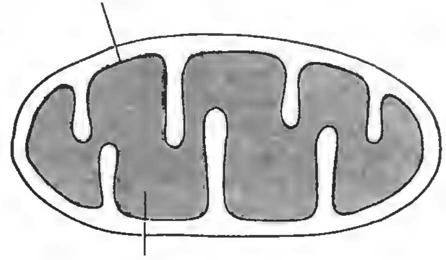


Рис. 16-11. Локализация ферментов цикла лимонной кислоты в митохондриях.

циклом лимонной кислоты или просто циклом Кребса.

Юджин Кеннеди и Альберт Ленинджер показали позднее, что все реакции цикла лимонной кислоты протекают в митохондриях животных клеток. В изолированных митохондриях печени крысы (разд. 2.8) были обнаружены не только все ферменты и коферменты цикла лимонной кислоты; здесь же, как выяснилось, локализованы все ферменты и белки, которые требуются для последней стадии дыхания, т.е. для переноса электронов и окислительного фосфорилирования. Поэтому митохондрии с полным правом называют «силовыми станциями» клетки. На рис. 16-11 показано, как размещены в митохондриях ферменты, катализирующие реакции цикла лимонной кислоты.

16.5. Цикл лимонной кислоты включает восемь стадий

Рассмотрим теперь восемь последовательных стадий цикла лимонной кислоты, уделяя особое внимание тем химическим превращениям, в результате которых ацетильная группа ацетил-СоА перестраивается и в конечном счете распадается с образованием CO_2 и атомов водорода, улавливаемых в форме восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$. На рис. 16-12 и 16-13 приведены сбалансированные уравнения реакций цикла и показана структура промежуточных продуктов.

а. Конденсация ацетил-СоА с оксалоацетатом приводит к образованию цитрата

Первая реакция цикла, катализируемая цитрат-синтазой, представляет собой конденсацию ацетил-СоА и оксалоацетата, в результате которой образуется цитрат (рис. 16-12). В этой реакции метильный углерод ацетильной группы ацетил-СоА связывается с карбонильной группой оксалоацетата; одновременно расщепляется тиоэфирная связь и высвобождается кофермент А:

$$\text{Ацетил-S-CoA} + \text{Оксалоацетат} + H_2O \xrightarrow{\text{Цитрат-синтаза}} \text{Цитрат} + \text{CoA-SH} + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -7{,}7 \text{ ккал/моль.}$$

Равновесие этой реакции в клетке по большей части сильно сдвинуто вправо, о чем свидетельствует характеризующая ее большая отрицательная величина стандартной свободной энергии гидролиза. Высвободившийся CoA-SH может теперь принять участие в окислительном декарбоксилировании новой молекулы пирувата и образовать новую молекулу ацетил-СоА, способную вступить в цикл. Полагают, что промежуточным продуктом в цитрат-синтазной реакции является цитрил-СоА. Он образуется в активном центре фермента и быстро гидролизуется, после чего свободный CoA-SH и цитрат отделяются от активного центра.

Цитрат-синтаза принадлежит к числу регуляторных ферментов: в клетках многих типов катализируемая ею реакция лимитирует общую скорость цикла лимонной кислоты.

б. Цитрат превращается в изоцитрат через цис-аконитат

Фермент *аконитаза* катализирует обратимое превращение *цитрата* в *изоцитрат*. В качестве промежуточного продукта (в норме не отделяющегося от активного центра фермента) образуется

Ацетил-Со А
Оксалоацетат
H_2O
Цитрат-синтаза
CoA-SH + H^+
Цитрат
$+H_2O$ / $-H_2O$
цис-Аконитат (связанный с ферментом)
Аконитаза Fe^{2+}
$-H_2O$ / $+H_2O$
Изоцитрат
Изоцитратдегидрогеназа Mg^{2+}
NAD^+ ($NADP^+$)
NADH (NADPH)
CO_2
α-Кетоглутарат

Рис. 16-12. Первые четыре реакции цикла лимонной кислоты. Приведены уравнения полного химического баланса.

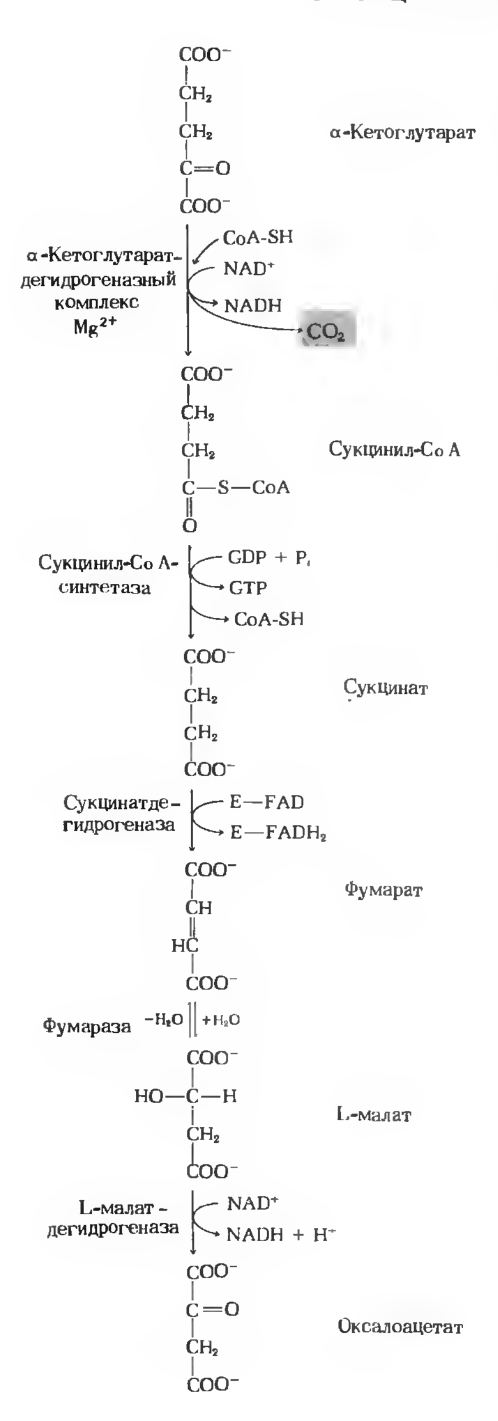


Рис. 16-13. Остальные реакции цикла лимонной кислоты (предшествующие стадии см. на рис. 16-12).

при этом трикарбоновая *цис*-аконитовая кислота (рис. 16-12). Аконитаза катализирует обратимое присоединение H_2O по двойной связи *цис*-аконитата (который присоединен к ферменту) двумя разными способами: в одном случае образуется цитрат, а в другом – изоцитрат:

$$\text{Цитрат} \underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}} [\textit{цис}\text{-Аконитат}] \underset{-H_2O}{\overset{+H_2O}{\rightleftharpoons}} \text{Изоцитрат}$$

Хотя в равновесной смеси при pH 7,4 и 25°C содержание изоцитрата составляет менее 10%, в клетке эта реакция протекает слева направо, поскольку продукт реакции, изоцитрат, быстро вовлекается в последующие стадии цикла. Аконитаза – довольно сложный фермент. Он содержит железо и кислотолабильные атомы серы, сгруппированные в так называемый железо-серный центр (разд. 17.8). Точная функция этого железо-серного центра (который представляет собой, как полагают, простетическую группу фермента) пока не известна.

в. *Изоцитрат дегидрируется с образованием α-кетоглутарата и CO_2*

На следующей стадии цикла изоцитрат дегидрируется с образованием α-кетоглутарата и CO_2 (рис. 16-12) под действием изоцитратдегидрогеназы. Существует два типа изоцитратдегидрогеназы: один использует в качестве акцептора электронов NAD^+, а другой – $NADP^+$. В остальном же суммарные реакции, катализируемые изоцитратдегидрогеназами этих двух типов, идентичны:

$$\text{Изоцитрат} + NAD^+ (NADP^+) \rightarrow \alpha\text{-Кетоглутарат} + CO_2 + NADH (NADPH) + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -5{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

В митохондриях содержатся изоцитратдегидрогеназы обоих типов, NAD-зависимая и NADP-зависимая; первый тип встречается только в митохондриях, а второй обнаруживается как в митохондриях, так и в цитозоле. В цикле лимонной кислоты, очевидно, принимают уча-

стие оба митохондриальных фермента, но преобладает NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа. Для ее действия необходимы ионы Mg^{2+} или Mn^{2+}, а также ее положительный модулятор ADP, в отсутствие которого фермент практически не проявляет активности. Наличие в митохондриях изоцитратдегидрогеназы двух типов, возможно, связано с регуляцией цикла.

г. α-Кетоглутарат окисляется до сукцината и CO_2

На следующей стадии цикла происходит окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата с образованием *сукцинил-СоА* и CO_2 (рис. 16-13), катализируемое *α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом*. Реакция описывается уравнением

$$\alpha\text{-Кетоглутарат} + NAD^+ + CoA \rightarrow \rightarrow \text{Сукцинил-CoA} + CO_2 + NADH.$$

Обратите внимание, что эта реакция практически идентична пируватдегидрогеназной реакции, о которой мы говорили выше; в обоих случаях речь идет об окислении α-кетокислоты, сопровождающемся утратой карбоксильной группы в виде CO_2. И по структуре, и по функции α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс очень напоминает пируватдегидрогеназный комплекс. Он состоит из трех ферментов, аналогичных трем ферментам пируватдегидрогеназной системы, и включает также связанные с ферментами кофакторы: тиаминпирофосфат, Mg^{2+}, кофермент А, NAD^+, FAD и липоевую кислоту. Есть, однако, и важное различие: α-кетоглутаратдегидрогеназная система не имеет столь сложного механизма регуляции, какой характерен для пируватдегидрогеназного комплекса.

д. Превращение сукцинил-СоА в сукцинат

Сукцинил-СоА, продукт предыдущей стадии цикла, представляет собой высокоэнергетическое соединение. Гидролиз его тиоэфирной связи, так же как и гидролиз ацетил-СоА, характеризуется большой отрицательной величиной изменения стандартной свободной энергии.

$$\text{Сукцинил-S-CoA} + H_2O \rightarrow \rightarrow \text{Сукцинат} + \text{CoA-SH} + H^+$$
$$\Delta G^{0\prime} = -8{,}0 \text{ ккал/моль}.$$

В клетке, однако, отщепление остатка СоА происходит не путем простого гидролиза, потому что такой путь означал бы растрачивание свободной энергии впустую. Разрыв тиоэфирной связи здесь сопряжен с реакцией, в ходе которой происходит запасание энергии с фосфорилированием гуанозиндифосфата (GDP) до гуанозинтрифосфата (GTP) (рис. 16-13):

$$\text{Сукцинил-S-CoA} + P_i + \text{GDP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{Сукцинат} + \text{GTP} + \text{CoA-SH}$$
$$\Delta G^{0\prime} = -0{,}7 \text{ ккал/моль}.$$

Участвующий в этой реакции фермент сукцинил-СоА—синтетаза катализирует образование свободного сукцината и одновременно с этим – образование концевой высокоэнергетической фосфатной группы GTP из GDP и P_i за счет свободной энергии, высвобождающейся при расщеплении сукцинил-СоА. У этой реакции, сопровождающейся запасанием энергии, есть промежуточный этап, во время которого происходит фосфорилирование самой молекулы фермента по одному из гистидиновых остатков в его активном центре. Именно богатая энергией фосфатная группа, участвующая в этом фосфорилировании, и переносится на GDP с образованием GTP. Сопряженное образование GTP за счет энергии, выделяющейся при окислительном фосфорилировании α-кетоглутарата, представляет собой еще один пример фосфорилирования на уровне субстрата. Вспомним, что нам уже знаком один пример фосфорилирования этого типа, а именно сопряженный синтез АТР за счет энергии, выделяющейся при окислении глицеральдегид-3-фосфата в ходе гликолиза (разд. 15.7, *б*). Подобные реакции принято называть фосфорилированием на уровне субстрата, потому что ис-

точником необходимой энергии служит для них окисление одного из органических субстратов. Объединяя реакции этого типа под общим названием, мы тем самым отличаем их от *окислительного фосфорилирования*, сопряженного с переносом электронов (его называют также *фосфорилированием в дыхательной цепи*; гл. 17).

GTP, образовавшийся под действием сукцинил-CoA–синтетазы, может затем передавать свою концевую фосфатную группу на ADP с образованием ATP; эта обратимая реакция катализируется *нуклеозид-дифосфат–киназой* (разд. 14.18)

$$GTP + ADP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftarrows} GDP + ATP$$

$$\Delta G^{0\prime} = 0{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

е. Дегидрирование сукцината с образованием фумарата

На следующей стадии цикла (рис. 16-13) сукцинат, образовавшийся из сукцинил-CoA, дегидрируется с образованием *фумарата*. Эта реакция катализируется флавопротеином сукцинатдегидрогеназой, молекула которого содержит ковалентно связанный *флавинадениндинуклеотид*. Эта простетическая группа, способная восстанавливаться, служит акцептором водорода в следующей реакции (E означает здесь ферментный белок):

$$\text{Сукцинат} + E\text{—}FAD \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Фумарат} + E\text{—}FADH_2.$$

Сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной. Молекулярная масса фермента, выделенного из митохондрий бычьего сердца, равна приблизительно 100 000. Одна молекула этого фермента содержит один остаток ковалентно связанного FAD и два железо-серных центра; в одном из этих центров находятся два атома железа, а в другом – четыре. В сукцинатдегидрогеназной реакции эти атомы железа изменяют свою валентность [Fe(II) — Fe(III)], и это позволяет считать, что они участвуют в переносе электронов (гл. 17).

Малонат является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы (разд. 9.13 и рис. 16-7); выше мы отмечали, что изучение его действия в немалой мере способствовало выяснению общей схемы цикла лимонной кислоты.

ж. Фумарат гидратируется с образованием малата

Обратимая гидратация фумарата, вследствие которой образуется L-малат (рис. 16-13)

$$\text{Фумарат} + H_2O \rightleftarrows \text{L-малат}$$

$$\Delta G^{0\prime} \simeq 0 \text{ ккал/моль,}$$

катализируется *фумарат-гидратазой*. Этот фермент, более известный под названием *фумараза*, был выделен в кристаллическом виде из сердца свиньи. Фумараза высокоспецифична: она гидратирует только *транс*-форму двойной связи фумарата и не действует на его *цис*-форму, а также ни на *цис*-, ни на *транс*-форму монокарбоновых ненасыщенных кислот. В обратной реакции (L-малат → → Фумарат) фумараза проявляет специфичность в отношении оптических изомеров; она неспособна катализировать дегидратацию D-малата. Молекулярная масса фумаразы равна приблизительно 200 000. Молекула фермента состоит из четырех субъединиц (четырех полипептидных цепей). Кофермент для фумаразы не требуется.

з. Малат дегидрируется с образованием оксалоацетата

На последней стадии цикла лимонной кислоты NAD-зависимая L-малатдегидрогеназа, содержащаяся в матриксе митохондрий, катализирует дегидрирование L-малата с образованием оксалоацетата (рис. 16-13):

$$\text{L-малат} + NAD^+ \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows \text{Оксалоацетат} + NADH + H^+$$
$$\Delta G^{0\prime} = +7{,}1 \text{ ккал/моль.}$$

Равновесие этой реакции при стандартных условиях (т. е. при концентрациях всех компонентов 1 М и pH 7,0) сильно сдвинуто влево. Тем не менее в интактных клетках реакция идет слева направо, потому что продукт этой реакции, оксалоацетат, быстро удаляется (расходуется в цитрат-синтазной реакции) и его реальная концентрация в клетке остается все время крайне низкой, меньше 10^{-6} М.

16.6. Общая характеристика цикла

Итак, мы закончили описание одного оборота цикла лимонной кислоты. Одна ацетильная группа, содержащая два атома углерода, вступает в цикл, соединяясь с оксалоацетатом. Два атома углерода освобождаются по завершении цикла в виде двуокиси углерода. В конце цикла регенерирует одна молекула оксалоацетата. От четырех промежуточных продуктов цикла в ферментативных реакциях дегидрирования отделяются четыре пары атомов водорода. Из них три пары используются для восстановления трех молекул NAD^+ в NADH, а одна – для восстановления FAD сукцинатдегидрогеназы в $FADH_2$. Четыре пары электронов от этих водородных атомов передаются в цепь переноса электронов и в конечном счете восстанавливают две молекулы O_2 с образованием четырех молекул H_2O. Отметим, что два углеродных атома, появляющиеся в виде CO_2,– это не те атомы, которые вступили в цикл в виде ацетильной группы. Для того чтобы углеродные атомы, вступившие в цикл в составе ацетильной группы, выделились, наконец, в виде CO_2, требуются дополнительные обороты цикла, как это видно из рис. 16-12 и 16-13.

В качестве побочного продукта цикла образуется одна молекула АТР, синтезируемая из ADP и фосфата через GTP, источником которого служит сукцинил-СоА-синтетазная реакция. В следующей главе мы познакомимся с тем, каким образом четыре пары электронов, отделившиеся от четырех пар водородных атомов в реакциях дегидрирования, передаются по цепи переноса электронов на молекулярный кислород с образованием H_2O. Хотя в каждом обороте цикла Кребса образуется только одна молекула АТР, четыре реакции дегидрирования, которые включает этот цикл, создают мощный поток высокоэнергетических электронов; эти электроны поступают в дыхательную цепь и таким путем обеспечивают в конечном счете образование большого числа молекул АТР в процессе окислительного фосфорилирования (гл. 17).

16.7. В чем смысл цикла лимонной кислоты?

Теперь мы можем задать один важный вопрос. Почему, собственно, для окисления простой двухуглеродной ацетильной группы требуется столь сложный цикл с последовательным образованием шести-, пяти- и четырехуглеродных промежуточных продуктов? Ответ на этот вопрос следует искать в некоторых закономерностях органической химии. Молекула уксусной кислоты при своих малых размерах и относительно простом строении отличается тем не менее одной особенностью, которая состоит в том, что ее метильная группа весьма устойчива к химическому окислению. Для прямого окисления ацетата до двух молекул CO_2 необходимы очень жесткие условия, совершенно несопоставимые с теми, какие существуют в клетках. Живые клетки в процессе эволюции научились использовать хотя и обходный, но зато более легкий путь, для которого не требуется столь высокой свободной энергии активации. Клетки научились присоединять ацетат к другому соединению (оксалоацетату) и получать таким образом продукт (цитрат), который гораздо легче, чем сам ацетат, поддается дегидрированию и декарбоксилированию. И хотя некоторые метаболические реакции, в частности цикл Кребса, кажутся нам на первый взгляд гораздо более сложными, чем это необходимо, тем не менее пристальное изучение таких случаев с точки зрения принципов, заложенных в механизмах органических реакций, показы-

вает, что в каждом из них избран наиболее легкий в химическом смысле путь, обеспечивающий данное превращение.

16.8. Применение изотопных методов в изучении цикла лимонной кислоты

Впервые предположение о существовании цикла лимонной кислоты было высказано на основании экспериментов с суспензиями измельченной мышечной ткани. Подробно ход превращений был выяснен позже с помощью высокоочищенных препаратов отдельных ферментов цикла. Предстояло установить, действительно ли эти ферменты функционируют в интактных клетках и достаточна ли скорость обращения веществ в цикле лимонной кислоты, чтобы с его помощью можно было обосновать суммарную скорость окисления глюкозы в животных тканях. Для получения ответа на эти вопросы были предприняты исследования с мечеными метаболитами, такими, как пируват или ацетат, у которых определенные атомы углерода в молекуле были помечены изотопами ^{13}C или ^{14}C. С помощью изотопных методов во многих строгих экспериментах были получены убедительные доказательства как самого существования цикла лимонной кислоты в интактных клетках, так и его высокой активности.

Некоторые ранние эксперименты с применением изотопов дали, однако, неожиданные результаты, породившие серьезную полемику о путях и механизмах отдельных реакций цикла лимонной кислоты. Эти результаты свидетельствовали, казалось бы, о том, что лимонная кислота не является первой трикарбоновой кислотой, образующейся в цикле. Соответственно и цикл стали называть не циклом лимонной кислоты, а циклом трикарбоновых кислот (сокращенно ЦТК). Позднее, однако, было твердо установлено, что в качестве первого продукта конденсации образуется именно лимонная кислота. Подробности, касающиеся этого эпизода из истории открытия цикла лимонной кислоты, мы приводим в дополнении 16-1.

Дополнение 16-1. Действительно ли первой из трикарбоновых кислот образуется в цикле лимонная кислота?

Как только стали доступны стабильный изотоп углерода ^{13}C и радиоактивные изотопы этого элемента ^{11}C и ^{14}C, исследователи сразу же воспользовались ими для того, чтобы проследить путь атомов углерода в цикле лимонной кислоты. В одном из таких экспериментов, положившем начало дискуссии о роли лимонной кислоты, ацетат, меченный по углероду карбоксильной группы ($CH_3\overset{*}{C}OO^-$), инкубировали в аэробных условиях с суспензией ткани. Поскольку ацетат в животных тканях превращается ферментативным путем в ацетил-СоА (разд. 18.2), такая постановка опыта давала возможность проследить путь карбоксильного углерода ацетильной группы ацетил-СоА в реакциях цикла. После инкубации из препарата ткани выделили α-кетоглутаровую кислоту. Ее подвергли расщеплению в обычных химических реакциях, чтобы установить положение метки, первоначально находившейся в карбоксильной группе ацетата. В результате конденсации немеченого оксалоацетата с ацетатом, меченным по карбоксильной группе, должен был образоваться цитрат, меченный только по одной из двух своих первичных карбоксильных групп (рис. 1). Поскольку молекула лимонной кислоты не обладает асимметрией, т. е. не

содержит асимметрического углеродного атома, две ее концевые карбоксильные группы химически неразличимы. Следовательно, одна половина меченых молекул цитрата, образовавшихся из меченого ацетата, должна была, казалось, дать α-кетоглутарат, несущий метку в α-карбоксильной группе, а другая половина – α-кетоглутарат с меткой в γ-карбоксильной группе; иными словами, должен был образоваться α-кетоглутарат, несущий метку в обеих карбоксильных группах.

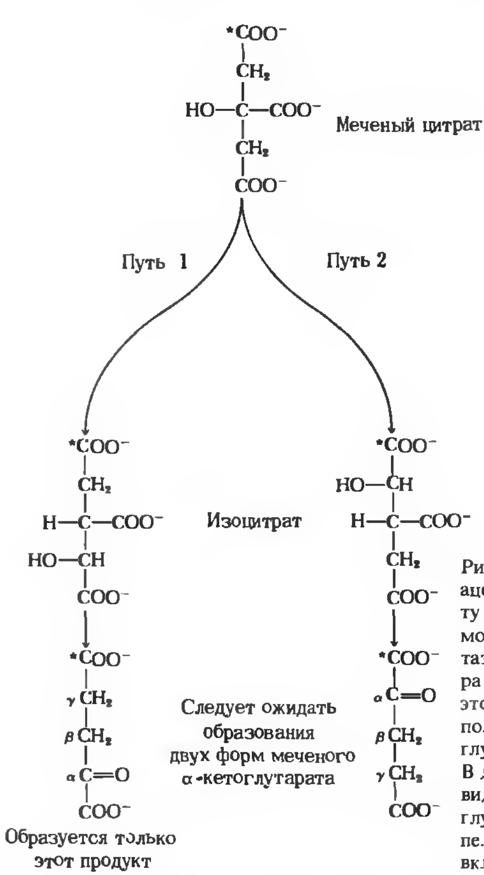


Рис. 1. Включение меченого атома углерода ацетильной группы в α-кетоглутаровую кислоту в цикле лимонной кислоты. Молекула лимонной кислоты, образующейся в цитрат-синтазной реакции, не содержит хирального центра (т. е. асимметрического атома углерода). Поэтому следовало ожидать, что из нее будут получаться два разных вида меченой α-кетоглутаровой кислоты, как показано на рисунке. В действительности же образуется лишь тот вид, к которому ведет путь 1, т. е. α-кетоглутарат, меченный по γ-карбоксильной группе. Углеродные атомы ацетильной группы, включившейся в цикл, выделены красным.

Однако, вопреки ожиданию, оказалось, что выделенный из тканевой суспензии α-кетоглутарат содержит метку только в одной γ-карбоксильной группе (рис. 1). На основании этого было сделано заключение, что ни сама лимонная кислота, ни какое-либо другое соединение с симметрическими молекулами не может быть промежуточным продуктом на пути от ацетата к α-кетоглутарату. Было высказано предположение, что первым продуктом конденсации ацетата с оксалоацетатом является не лимонная, а какая-то асимметрическая трикарбоновая кислота, по-видимому *цис*-аконитовая или изолимонная. Из-за этого было изменено и название цикла – его стали называть циклом трикарбоновых кислот.

Однако в 1948 г. А. Огстон, биохимик из Оксфордского университета, указал, что хотя молекула лимонной кислоты и не содержит асимметрического атома углерода, она тем не менее может вести себя как

асимметрическое соединение, если атакующий ее фермент имеет асимметрический активный центр. Огстон предположил, что в активном центре аконитазы (фермента, действующего на новообразованный цитрат) имеются три точки для связывания молекулы цитрата и что эта молекула присоединяется к активному центру фермента специфическим образом в трех этих точках сразу. Как видно из рис. 2, присоединение молекулы цитрата к трем точкам может реализоваться только одним-единственным путем, и это объясняет нам, почему метка обнаруживается только в одной из двух карбоксильных групп α-кетоглутарата.

Рис. 2. Лимонная кислота относится к прохиральным соединениям. Это ее свойство проще всего объяснить, представив себе, что молекула лимонной кислоты присоединяется к активному центру фермента аконитазы специфическим образом в трех точках. Хотя в этой молекуле нет асимметрического атома углерода, три различных заместителя при ее центральном углеродном атоме могут присоединяться к комплементарным группам активного центра фермента только одним-единственным способом. *А*. Структура лимонной кислоты. *Б*. Схематическое изображение молекулы лимонной кислоты: X = $-OH$, Y = $-COO^-$, Z = $-CH_2COO^-$. *В*. Правильная комплементарная «подгонка» молекулы лимонной кислоты к связывающему участку (активному центру) аконитазы. Существует только один способ присоединения трех специфических групп лимонной кислоты к трем связывающим точкам активного центра аконитазы. Поэтому аконитаза может взаимодействовать только с одной из двух групп, а именно с группой $-CH_2COO^-$.

Органические соединения, не имеющие в своей молекуле хирального центра, но потенциально способные взаимодействовать с асимметрическими активными центрами фермента как асимметрические соединения, называются прохиральными.

16.9. Превращение пирувата в ацетил-СоА регулируется

Из гл. 15 мы знаем, что скорость гликолиза регулируется на двух уровнях. В первую очередь регулируется, как мы видели, сама подача «топлива» для гликолиза. В этой регуляции участвуют два регуляторных фермента, контролирующих вхождение глюкозы в последовательность гликолитических реакций,— гексокиназа, катализирующая фосфорилирование D-глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, и гликоген-фосфорилаза, катализирующая первый этап образования глюкозо-6-фосфата из гликогена. Скорость цикла лимонной кислоты регулируется также прежде всего за счет скорости образования «топлива» для этого цикла. Этим «топливом» является ацетил-СоА, образующийся при окислении пирувата и жирных кислот (гл. 18). На рис. 16-14 показано, как реакция образования ацетил-СоА, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом, регулируется в животных тканях при помощи ковалентной модификации этого комплекса (разд. 9.22). Когда концентрация АТР в митохондриях относительно велика и когда ацетил-СоА, а также промежуточные продукты цикла Кребса имеются в достаточном количестве, обеспечивающем удовлетворение энергетических нужд клетки, дальнейшее образова-

ние ацетил-CoA приостанавливается. В этих условиях, которые служат сигналом для такой приостановки, ATP является положительным модулятором, активирующим вспомогательный фермент – *киназу пируватдегидрогеназы*. Этот фермент использует ATP для фосфорилирования остатка серина в активном центре молекулы пируватдегидрогеназы, в результате чего образуется неактивная форма фермента – фосфопируватдегидрогеназа (рис. 16-14). Если, однако, потребность в ATP возрастает и уровень ATP соответственно снижается, то неактивная, фосфорилированная, форма пируватдегидрогеназы может быть вновь активирована. Это происходит в результате гидролитического отщепления от молекулы пируватдегидрогеназы ингибирующей фосфатной группы. Катализирует эту реакцию другой фермент – *фосфатаза фосфопируватдегидрогеназы*. Стимулирующее действие на этот фермент оказывает повышение концентрации ионов Ca^{2+}, играющих роль важного метаболического посредника; концентрация ионов Ca^{2+} увеличивается всякий раз, когда возникает потребность в ATP. Киназа пируватдегидрогеназы и фосфатаза фосфопируватдегидрогеназы присутствуют в пируватдегидрогеназном комплексе. Этот комплекс, следовательно, представляет собой очень сложную, независимую и саморегулирующуюся систему.

Пируватдегидрогеназный комплекс регулируется также путем аллостерической модуляции. Сильное ингибирующее действие оказывают на него (помимо ATP) ацетил-CoA и NADH, которые являются продуктами пируватдегидрогеназной реакции и в то же время играют роль аллостерических ингибиторов этой системы. Аллостерическое ингибирование окисления пирувата резко усиливается в присутствии высокомолекулярных жирных кислот; позже мы узнаем (гл. 18), что жирные кислоты тоже служат источником ацетил-CoA. Таким образом, каталитическая активность пируватдегидрогеназного комплекса выключается в тех случаях, когда в клетках имеется достаточно топлива в виде жирных кислот и ацетил-CoA или когда в них повышаются концентрация ATP и отношение $NADH/NAD^+$.

16.10. Цикл лимонной кислоты регулируется

Познакомимся теперь с тем, каким образом регулируется сам цикл лимонной кислоты (рис. 16-15). В большинстве случаев скорость функционирования метаболических циклов определяется их начальными этапами. Полагают, что так же обстоит дело и в случае цикла лимонной кислоты. Общая скорость его функционирования во многих тканях определяется первой реакцией:

$$\text{Ацетил-CoA} + \text{Оксалоацетат} \rightarrow \rightarrow \text{Цитрат} + \text{CoA}.$$

Разумеется, скорость цитрат-синтазной реакции регулируется концентрацией ее

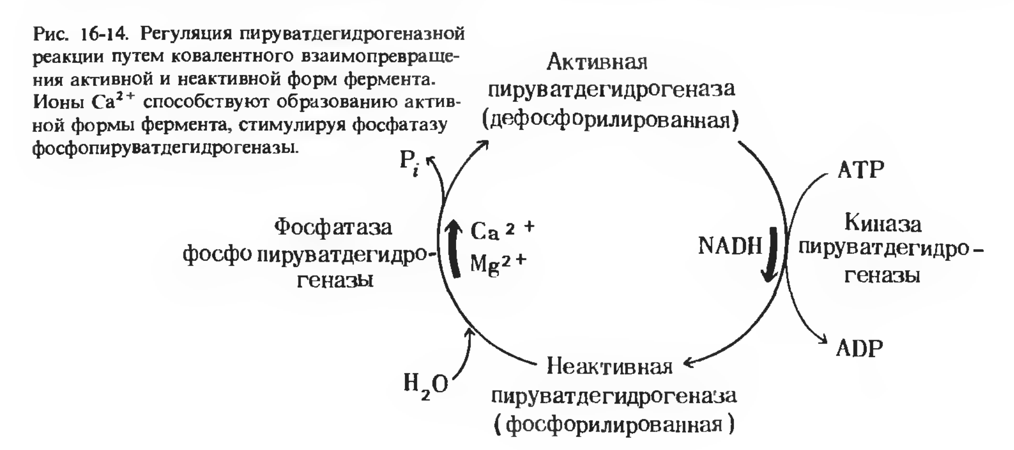


Рис. 16-14. Регуляция пируватдегидрогеназной реакции путем ковалентного взаимопревращения активной и неактивной форм фермента. Ионы Ca^{2+} способствуют образованию активной формы фермента, стимулируя фосфатазу фосфопируватдегидрогеназы.

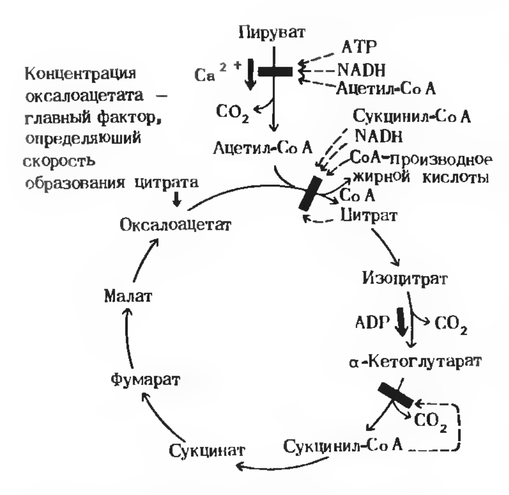


Рис. 16-15. Регуляция цикла лимонной кислоты при окислении пирувата в животных клетках. ATP, NADH, ацетил-CoA и Ca^{2+} контролируют скорость образования ацетил-CoA из пирувата; скорость же функционирования цикла лимонной кислоты в целом регулируется концентрацией оксалоацетата, а также активностью цитрат-синтазы и изоцитратдегидрогеназы.

субстратов, в частности концентрацией ацетил-CoA, а она в свою очередь зависит от активности пируватдегидрогеназного комплекса. Регулируется эта реакция также концентрацией второго субстрата – оксалоацетата; возможно даже, что этот фактор играет главную роль, поскольку концентрация оксалоацетата в митохондриях очень низка и зависит от метаболических условий. На активность цитрат-синтазы влияет также концентрация сукцинил-CoA, одного из более поздних промежуточных продуктов цикла. Как только концентрация сукцинил-CoA превышает нормальный стационарный уровень, цитрат-синтаза сразу же ингибируется, поскольку сукцинил-CoA понижает ее сродство к ацетил-CoA. Жирные кислоты, служащие предшественниками ацетил-CoA, тоже ингибируют цитрат-синтазу посредством аллостерических эффектов. В некоторых клетках роль ингибиторов цитрат-синтазы играют цитрат и NADH.

У большей части клеток окисление изоцитрата до α-кетоглутарата и CO_2, которое может происходить под действием двух разных изоцитратдегидрогеназ, регулируется, по-видимому, путем аллостерической стимуляции NAD-зависимого фермента, вызываемой ADP. В то же время NADH и NADPH действуют как отрицательные модуляторы изоцитратдегидрогеназной активности. Ингибитором активности α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса служит продукт реакции сукцинил-CoA. Таким образом, в цикле лимонной кислоты регулируются по меньшей мере три стадии, и только в своих деталях эта регуляция у разных типов клеток несколько различается.

Скорость гликолиза в нормальных условиях согласована со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты: в клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколько необходимо для того, чтобы обеспечить цикл лимонной кислоты «топливом», т. е. ацетильными группами ацетил-CoA. Ни пируват, ни лактат, ни ацетил-CoA обычно не накапливаются в аэробных клетках в больших количествах; их концентрации поддерживаются на некоем постоянном уровне, соответствующем динамическому равновесию. Согласованность между скоростью гликолиза и скоростью функционирования цикла лимонной кислоты объясняется не только тем, что первый процесс ингибируется высокими концентрациями ATP и NADH, т. е. компонентами, общими для гликолитической и дыхательной стадий окисления глюкозы; определенную роль в этой согласованности играет также и концентрация цитрата. Продукт первой стадии цикла лимонной кислоты – цитрат – является аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы, катализирующей в процессе гликолиза реакцию фосфорилирования фруктозо-6-фосфата (разд. 15.13 и рис. 15.15).

16.11. Промежуточные продукты цикла лимонной кислоты используются также и в других метаболических реакциях, а убыль их постоянно восполняется

Цикл лимонной кислоты – это один из амфиболических путей (разд. 13.7). Он

используется не только для окислительного катаболизма, т.е. для расщепления углеводов, жирных кислот и аминокислот, но может служить также первой стадией многих биосинтетических путей, для которых он является источником предшественников. Под воздействием ряда важных вспомогательных ферментов некоторые промежуточные продукты цикла лимонной кислоты, главным образом α-кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат, могут удаляться из цикла и использоваться в качестве предшественников аминокислот (гл. 22). Скорость функционирования цикла лимонной кислоты при этом, казалось бы, должна снижаться, поскольку такой отток промежуточных продуктов из цикла должен понижать их концентрацию в клетке. В действительности же этого не происходит, так как убыль промежуточных продуктов цикла восполняется благодаря действию другого набора ферментов. При нормальных условиях реакции, отвлекающие промежуточные продукты из цикла, и реакции, восполняющие их убыль, находятся в состоянии динамического равновесия, так что концентрация этих продуктов в митохондриях остается более или менее постоянной.

Специальные ферментативные реакции, обеспечивающие пополнение пула промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, носят название *анаплеротических* («пополняющих») реакций. Наиболее важная реакция такого рода в животных тканях – это ферментативное карбоксилирование пирувата за счет CO_2 с образованием оксалоацетата (рис. 16-16); катализирует эту обратимую реакцию фермент *пируваткарбоксилаза*

$$\text{Пируват} \underset{Mg^{2+}}{+} CO_2 + ATP + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + ADP + P_i + 2H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -0{,}5 \text{ ккал/моль.}$$

Если для цикла лимонной кислоты не хватает оксалоацетата или какого-нибудь другого промежуточного продукта цикла, то карбоксилирование пирувата стимулируется и запас оксалоацетата растет. Для ферментативного присоединения карбоксильной группы к молекуле пирувата требуется энергия. Источником ее служит сопряженное с данной реакцией расщепление ATP до ADP и фосфата. Поскольку суммарная реакция сопровождается лишь незначительным изменением стандартной свободной энергии, мы можем заключить, что свободная энергия, необходимая для присоединения карбоксильной группы к пирувату, примерно равна свободной энергии, выделяющейся при гидролизе ATP.

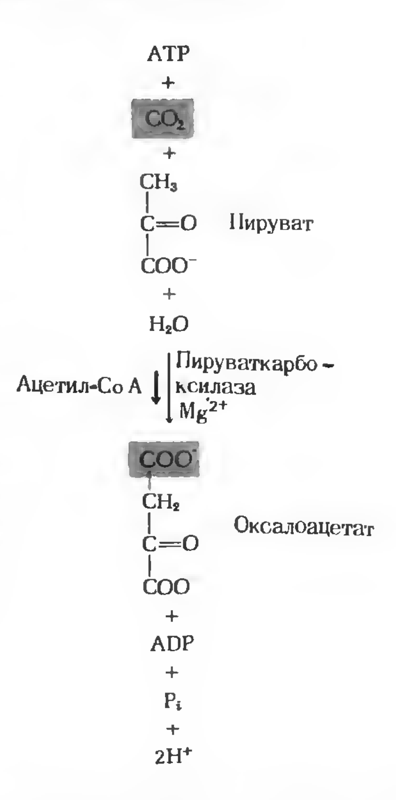


Рис. 16-16. Пируваткарбоксилазная реакция и ее стимуляция положительным модулятором ацетил-CoA. Включившаяся CO_2 показана на красном фоне.

Пируваткарбоксилаза – очень сложный фермент. Его молекулярная масса равна приблизительно 650 000. Молекула фермента содержит четыре простетические группы. Каждая из них состоит из одной молекулы витамина *биотина* (разд. 10.9),

ковалентно связанного (пептидной связью) с ε-аминогруппой особого остатка лизина, находящегося в активном центре (рис. 16-17). Свободная CO_2, предшественник новой карбоксильной группы оксалоацетата, сначала активируется путем присоединения к одному из атомов азота в молекуле биотина. Эта активация, связанная с расходованием ATP, составляет первую стадию реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой (E означает здесь фермент):

$$\text{ATP} + CO_2 + \text{E-биотин} + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{ADP} + P_i + \text{E-биотин-COO}^- + 2H^+.$$

На второй стадии, протекающей также в активном центре фермента, новая карбоксильная группа, ковалентно связанная с простетической группой фермента, переносится на пируват с образованием оксалоацетата (рис. 16-16):

$$\text{E-биотин-COO}^- + \text{Пируват} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{E-биотин} + \text{Оксалоацетат}.$$

Пируваткарбоксилаза принадлежит к регуляторным ферментам. В отсутствие ацетил-СоА, который служит для нее положительным модулятором, скорость катализируемой ею прямой реакции, приводящей к образованию оксалоацетата, очень невелика (рис. 16-16). Избыток же ацетил-СоА, поставляющего «топливо» для цикла лимонной кислоты, стимулирует пируваткарбоксилазную реакцию; в результате этого образуется больше оксалоацетата и цикл использует больше ацетил-СоА в цитрат-синтазной реакции.

Пируваткарбоксилазная реакция — главная анаплеротическая реакция в печени и почках. В миокарде и в мышцах протекают другие анаплеротические реакции. Одна из таких реакций катализируется фосфоенолпируваткарбоксикиназой (гл. 20)

$$\text{Фосфоенолпируват} + CO_2 +$$

$$+ \text{GDP} \xrightarrow{Mn^{2+}} \text{Оксалоацетат} + \text{GTP}.$$

В этой реакции происходит расщепление фосфоенолпирувата – сверхвысокоэнергетического фосфорилированного соединения, образующегося в процессе гликолиза. Высвобождаемая энергия используется для карбоксилирования с образованием оксалоацетата, а ее остаток запасается в форме GTP.



Рис. 16-17. Простетическая группа пируваткарбоксилазы. Карбоксильная группа биотина образует пептидную связь с ε-аминогруппой остатка лизина, входящего в состав активного центра фермента. CO_2 активируется, образуя N-карбоксипроизводное биотинильной простетической группы. Затем эта карбоксильная группа - непосредственный донор CO_2 для пирувата - переносится на пируват.

16.12. Глиоксилатный цикл – одна из модификаций цикла лимонной кислоты

У растений и некоторых микроорганизмов, например у *E. coli*, ацетильные группы часто служат не только высокоэнергетическим «топливом», но и источником метаболитов, из которых строятся углеродные скелеты углеводов. В таких клетках действуют два варианта цикла лимонной кислоты: 1) обычная последо-

вательность реакций, в ходе которой происходит окисление ацетил-CoA до CO_2, свойственная большинству тканей, и 2) особая ее модификация, называемая *глиоксилатным циклом* (рис. 16-18). Суммарное уравнение для глиоксилатного цикла, который тоже можно рассматривать как анаплеротический путь, имеет вид

$$2\text{Ацетил-S-CoA} + NAD^+ + 2H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{Сукцинат} + 2\text{CoA-SH} + NADH + 3H^+.$$



Рис. 16-18. Глиоксилатный цикл. Красным выделены реакции, катализируемые изоцитрат-лиазой (ее называют также изоцитратазой) и малат-синтазой. Все остальные реакции те же, что и в цикле лимонной кислоты.

В глиоксилатном цикле ацетил-CoA взаимодействует с оксалоацетатом, в результате чего образуется цитрат (рис. 16-18). Однако расщепление изоцитрата происходит не в обычной изоцитратдегидроненазной реакции, как в цикле лимонной кислоты, а особым путем – под действием фермента *изоцитрат-лиазы* с образованием *сукцината* и *глиоксилата*. Образовавшийся глиоксилат далее конденсируется с другой молекулой ацетил-CoA, что приводит к образованию малата; эта реакция катализируется *малат-синтазой* (рис. 16-19). Затем малат окисляется до оксалоацетата, который может конденсироваться с новой молекулой ацетил-CoA, начиная тем самым новый оборот цикла. При каждом обороте глиоксилатного цикла в него вступают две молекулы ацетил-CoA и образуется одна молекула сукцината, которая затем используется в процессах биосинтеза. Сукцинат может превращаться через фумарат и малат в оксалоацетат, из которого образуется фосфоенолпируват путем обращения описанной выше фосфоенолпируваткарбоксикиназной реакции. Фосфоенолпируват используется в качестве предшественника при биосинтезе глюкозы (гл. 20). У животных глиоксилатный цикл отсутствует; изоцитрат-синтазы и малат-лиазы в животных клетках нет. В организме животных существуют другие пути для синтеза углеводов из простых предшественников (гл. 20). В прорастающих семенах глиоксилатный цикл, напротив, функционирует очень активно: таким путем из ацетильных групп (источником которых служат жирные кислоты, входящие в состав запасных триацилглицеролов) образуется глюкоза. Ферменты изоцитрат-лиаза и малат-синтаза находятся в растительных клетках в особых цитоплазматических органеллах – *глиоксисомах*.

16.13. Вторичные пути катаболизма глюкозы: пентозофосфатный путь

Бóльшая часть глюкозы расщепляется в животных тканях по гликолитическому пути с образованием пирувата. В свою очередь бóльшая часть пирувата окисляется через цикл лимонной кислоты. Главный смысл расщепления глюкозы в процессе гликолиза заключается в обеспечении клетки энергией в форме ATP. Наряду с этим существуют, однако, и другие, второстепенные, пути катаболизма глюкозы, имеющие специальное назначение. Эти пути составляют часть

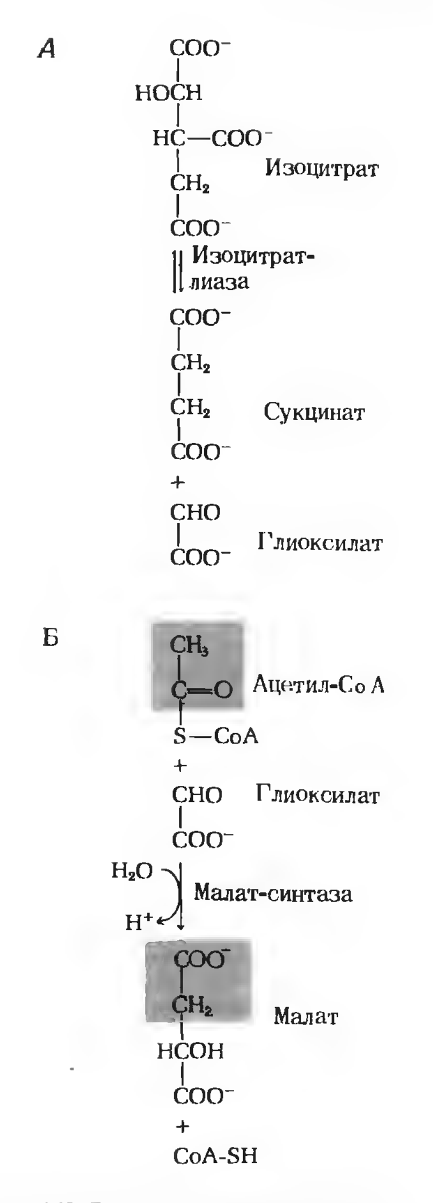


Рис. 16-19. Реакции, свойственные только глиоксилатному циклу. *А*. Превращение изоцитрата в сукцинат и глиоксилат. *Б*. Конденсация глиоксилата и ацетил-СоА, в результате которой образуется малат.

вторичного метаболизма глюкозы, на них вырабатываются особые продукты, в которых нуждается клетка. В этом разделе и в следующем мы коротко охарактеризуем два таких пути.

Пентозофосфатный путь, называемый также *фосфоглюконатным путем* (рис. 16-20), поставляет в животных тканях два специальных продукта: NADH и рибозо-5-фосфат. Напомним, что NADH является одним из переносчиков химической энергии и что он передает эту энергию в форме *восстановительной способности* (разд. 13.9). Особенно важна эта функция в тех тканях, в которых протекает активный биосинтез жирных кислот и стероидов из малых молекул-предшественников, в частности в молочной железе, жировой ткани, коре надпочечников и печени. При биосинтезе жирных кислот восстановительная способность в форме NADH требуется для восстановления двойных связей в молекулах, играющих в этом процессе роль промежуточных продуктов. В тканях, в которых биосинтез жирных кислот выражен слабо, например в скелетных мышцах, пентозофосфатный путь практически отсутствует. Другая функция этого пути заключается в образовании пентоз (в частности, D-рибозы), которые используются для синтеза нуклеиновых кислот.

Первой реакцией пентозофосфатного пути является ферментативное дегидрирование глюкозо-6-фосфата до *6-фосфоглюконата*, катализируемое *глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой* (рис. 16-20). Акцептором электронов служит при этом $NADP^+$. В качестве первого продукта образуется *6-фосфоглюконо-δ-лактон*, гидролизующийся затем до свободной кислоты под действием специфической *лактоназы* (рис. 16-20). Равновесие суммарной реакции сильно смещено в сторону образования NADPH. На следующей стадии 6-фосфоглюконат подвергается дегидрированию и декарбоксилированию под действием *6-фосфоглюконатдегидрогеназы*. Эта реакция приводит к образованию кетопентозы *D-рибулозо-5-фосфата* (рис. 16-20) и еще одной молекулы NADPH. *Фосфопентозоизомераза* катализирует превращение D-рибулозо-5-фосфата в его альдоизомер, D-рибозо-5-фосфат (рис. 16-20), который может использоваться при биосинтезе рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. В некоторых клетках пентозофосфатный путь на этом кончается, и тогда

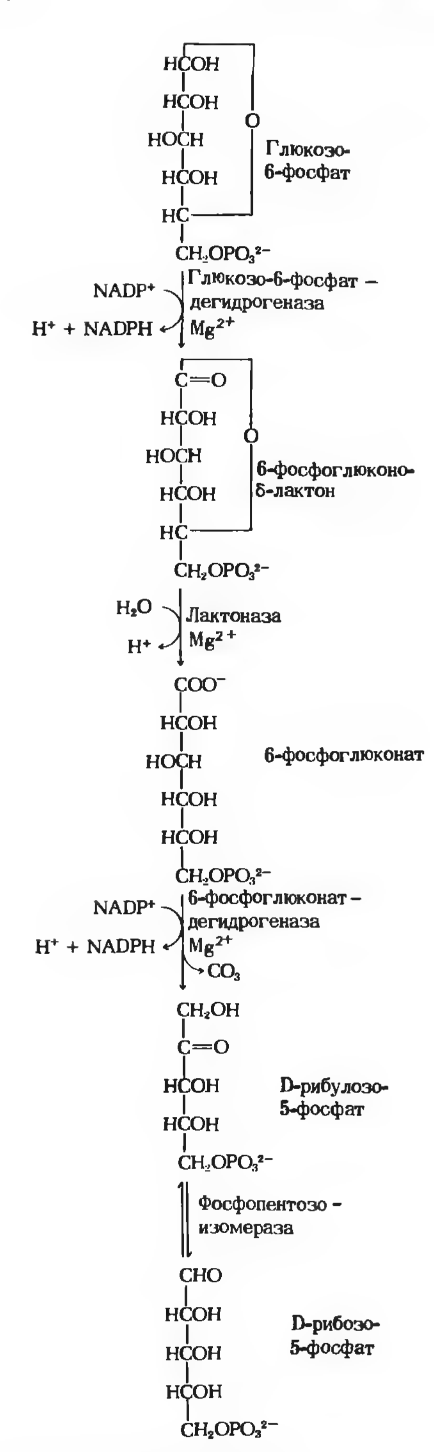


Рис. 16-20. Пентозофосфатный путь.

его суммарное уравнение может быть записано в следующем виде:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{D-рибозо-5-фосфат} + CO_2 + 2NADPH + 2H^+.$$

В итоге образуются NADPH, который используется для реакций восстановительного биосинтеза в цитоплазме, и D-рибозо-5-фосфат, играющий роль предшественника при синтезе нуклеотидов.

Пентозофосфатный путь активно реализуется и в эритроцитах человека. Образующийся NADPH предохраняет ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточной мембраны, от аномальных взаимодействий с кислородом, и он же способствует поддержанию нормальной степени окисления атомов железа гемоглобина (Fe^{2+}). Существует группа наследственных болезней человека, при которых активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и некоторых других ферментов пентозофосфатного пути понижена или вообще отсутствует. У таких больных наблюдается патологический *гемолиз* – разрушение эритроцитов с выделением из них (через поврежденную мембрану) гемоглобина, что приводит к развитию анемии. Состояние резко ухудшается под влиянием некоторых лекарственных препаратов, особенно под влиянием противомалярийного препарата *примахина*. В Африке и Азии от этих наследственных болезней страдают многие миллионы людей.

Ниже мы рассмотрим другие аспекты пентозофосфатного пути (гл. 23).

16.14. Вторичный путь, по которому происходит превращение глюкозы в глюкуроновую и аскорбиновую кислоты

По другому вторичному пути катаболизма глюкозы в животных тканях образуются два специализированных продукта: D-*глюкуронат*, важная роль которого связана с обезвреживанием и выведением

из организма чужеродных органических веществ, и *L-аскорбиновая кислота* (*витамин С*) (рис. 16-21). В этом случае D-глюкозо-1-фосфат сначала взаимодействует с UTP и превращается в UDP-глюкозу. Затем глюкозная часть молекулы UDP-глюкозы подвергается ферментативному дегидрированию с образованием *UDP-D-глюкуроната*. Эта реакция представляет собой еще один пример использования UDP-производных в качестве промежуточных продуктов при ферментативных превращениях сахаров (разд. 15.9). UDP-D-глюкуронат способствует обезвреживанию некоторых чужеродных веществ или лекарственных препаратов (например, фенола) и таким образом усиливает их выведение через почки (рис. 16-21). Кроме того, UDP-глюкуронат служит предшественником D-глюкуронатных остатков в молекулах таких кислых полисахаридов, как гиалуроновая кислота и гепарин (разд. 11.12).

D-глюкуронат играет также роль промежуточного продукта в процессе превращения D-глюкозы в L-аскорбиновую кислоту. Он восстанавливается за счет NADPH до шестиуглеродной сахарной

Рис. 16-21. Вторичный путь превращения глюкозы — через UDP-глюкуроновую кислоту.

кислоты – *L-гулоната*, которая затем превращается в соответствующий лактон. *L-гулонолактон* дегидрируется до L-аскорбиновой кислоты, или витамина С, при участии флавопротеина *гулонолактон – оксидазы*. Именно этим путем синтезируется L-аскорбат в растениях и у тех животных, которые способны обеспечивать себя этим витамином. В организме человека, морской свинки, обезьян, некоторых видов птиц и индийской плодоядной летучей мыши витамин С не синтезируется: эти виды должны получать его в готовом виде, с пищей. Человек, морская свинка и разные виды обезьян не синтезируют витамин С потому, что у них отсутствует фермент гулонолактон – оксидаза. Можно думать, что некогда все организмы располагали набором ферментов, необходимых для синтеза аскорбата, но затем какие-то виды утратили эту способность к синтезу вследствие мутации, которая, однако, не оказалась для них летальной, поскольку обычную пищу данного вида составляли богатые витамином С растения.

Доля глюкозы, отвлекаемой на этот вторичный путь, очень невелика по сравнению с большим ее количеством, расщепляемым в процессе гликолиза и через цикл лимонной кислоты. Однако продукты таких вторичных путей жизненно необходимы организму.

Краткое содержание главы

Клеточное дыхание включает три стадии: 1) окислительное образование ацетил-СоА из пирувата, жирных кислот и аминокислот, 2) расщепление ацетильных остатков в цикле лимонной кислоты, в результате которого образуются CO_2 и атомы водорода, и 3) перенос электронов на молекулярный кислород, сопряженный с окислительным фосфорилированием ADP до АТР. При окислительном катаболизме глюкозы выделяется гораздо больше энергии, чем при анаэробном гликолизе. В аэробных условиях конечный продукт гликолиза прируват подвергается сначала дегидрированию и декарбоксилированию с образованием ацетил-СоА и CO_2. Катализирует этот процесс пируватдегидрогеназный комплекс, состоящий из трех последовательно действующих ферментов. Цикл лимонной кислоты протекает в митохондриях. Он начинается реакцией, в которой цитрат-синтаза катализирует конденсацию ацетил-СоА и оксалоацетата, в результате чего образуется цитрат. В присутствии аконитазы цитрат в обратимой реакции превращается в изоцитрат, который затем дегидрируется с образованием α-кетоглутарата и CO_2 с помощью NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ. В результате дегидрирования и декарбоксилирования α-кетоглутарата образуются сукцинил-СоА и CO_2. Сукцинил-СоА взаимодействует при участии сукцинил-СоА – синтетазы с GDP и фосфатом, в результате чего образуется свободный сукцинат, а также GTP, который затем передает свою концевую фосфатную группу на ADP. Сукцинат окисляется до фумарата под действием одного из флавинсодержащих ферментов – сукцинатдегидрогеназы. Фумарат обратимо гидратируется фумаразой с образованием L-малата, который затем окисляется NAD-зависимой L-малатдегидрогеназой. В результате окисления малата регенерирует одна молекула оксалоацетата. Эта молекула может теперь соединиться с новой молекулой ацетил-СоА и тем самым начать новый оборот цикла. Опыты с изотопной меткой, в которых изотопами углерода были помечены молекулы «топлива» или промежуточные продукты, убедительно доказали, что цикл лимонной кислоты представляет собой главный путь окисления углеводов в животных клетках. Общая скорость функционирования цикла в печени определяется скоростью превращения пирувата в ацетил-СоА, а также скоростью реакции, в ходе которой из ацетил-СоА образуется цитрат. Эта реакция катализируется цитрат-синтазой, аллостерическим ферментом, на который оказывают ингибирующее действие сукцинил-СоА и некоторые другие вещества, играющие роль отрицательных модуляторов.

Промежуточные продукты цикла лимонной кислоты используются также

в качестве предшественников при биосинтезе аминокислот и других биомолекул. Их убыль восполняется благодаря анаплеротическим реакциям. Среди этих реакций главную роль играет сопровождающаяся расходованием АТР реакция карбоксилирования пирувата, в результате которой образуется оксалоацетат. В растениях и некоторых микроорганизмах, для которых единственным источником углерода при синтезе углеводов служит ацетат, действует глиоксилатный цикл, представляющий собой модификацию цикла лимонной кислоты. Этот путь обеспечивает образование из ацетил-СоА сукцината и некоторых других промежуточных продуктов для нужд биосинтеза.

Глюкоза может вступать во вторичные катаболические реакции, в результате которых образуются специальные продукты. Пентозофосфатный путь, начинающийся с дегидрирования глюкозо-6-фосфата, поставляет рибозо-5-фосфат и NADPH. Реакции пентозофосфатного пути, приводящие к этим продуктам, протекают в растворимой части цитоплазмы – цитозоле. Рибозофосфаты служат предшественниками при синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а NADPH используется в качестве главного восстановителя при биосинтезе таких богатых водородом соединений, как жирные кислоты и холестерол. Из глюкозы образуется и UDP-D-глюкуронат, который способствует обезвреживанию некоторых чужеродных веществ в организме, а также является предшественником L-аскорбиновой кислоты (витамина С).

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Goodwin T. W. (ed.). The Metabolic Roles of Citrate, Academic, New York, 1968. Симпозиум в честь сэра Ганса Кребса.

Lehninger A. L. Biochemistry, 2d ed., Worth, New York, 1975. (Имеется перевод: Ленинджер А. Биохимия.– М.: Мир, 1976.) В гл. 17 содержится подробное описание цикла.

Lowenstein J. M. (ed.). Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation, Dekker, New York, 1969.

Статьи

Hansford R. G. Control of Mitochondrial Substrate Oxidation, Curr. Top. Bioenerget., **10**, 217–278 (1980). Подробное рассмотрение регуляции цикла лимонной кислоты.

Krebs H. A. The History of the Tricarboxylic Acid Cycle, Perspect. Biol. Med., **14**, 154–170 (1970). Увлекательный рассказ об открытии цикла лимонной кислоты.

Lowenstein J. M. The Tricarboxylic Acid Cycle, pp. 146–270. In: D. M. Greenberg (ed.), Metabolic Pathways, 3d ed., vol. 1, Academic, New York, 1967.

Reed L. J. Multienzyme Complexes, Acc. Chem. Res., **7**, 40–46 (1974).

Srere P. A. The Enzymology of the Formation and Breakdown of Citrate, Adv. Enzymol., **43**, 57–101 (1975).

Williamson D. H. Sir Hans Krebs, the First 80 Years. Trends Biochem. Sci., **5**, vi–viii, August 1980. Краткая биография.

Вопросы и задачи

1. *Баланс цикла лимонной кислоты.* В цикле лимонной кислоты для расщепления ацетил-СоА используются восемь ферментов: цитрат-синтаза, аконитаза, изоцитратдегидрогеназа, α-кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинил-СоА-синтетаза, сукцинатдегидрогеназа, фумараза и малатдегидрогеназа.
   а) Напишите уравнение химического баланса для реакций, катализируемых каждым из этих ферментов.
   б) Какой кофактор (или кофакторы) необходим для каждой из этих реакций?
   в) Для каждого из ферментов укажите, к какому из перечисленных ниже типов принадлежит катализируемая им реакция: конденсация (образование углерод-углеродной связи); дегидратация (отщепление воды); гидратация (присоединение воды); декарбоксилирование (отщепление CO_2); окисление – восстановление; фосфорилирование на уровне субстрата; изомеризация.
   г) Напишите суммарное уравнение химического баланса для превращения ацетил-СоА в двуокись углерода.
2. *Распознавание окислительно-восстановительных реакций в процессах метаболизма.* Биохимическая стратегия живых организмов заключается в постадийном окислении органических соединений до двуокиси углерода и воды. Благодаря сопряжению этих реакций с другими реакциями значительная часть энергии, выс-

вобождающейся при окислении, запасается в форме ATP. Важно уметь распознавать окислительно-восстановительные процессы в метаболизме, исходя из наблюдаемых химических превращений. Восстановление какой-либо органической молекулы происходит в результате гидрирования (присоединения водорода H–H) по двойной связи (1) или по простой связи – в этом случае с ее разрывом (2). Окисление же, наоборот, происходит в результате дегидрирования (отщепление водорода H–H). В биохимических окислительно-восстановительных реакциях (см. ниже, п. 3) функцию дегидрирования - гидрирования органических молекул выполняют в присутствии соответствующих ферментов сопряженные пары коферментов: NAD^+–NADH и FAD–$FADH_2$.

г) $CH_2(OH)-CH(OH)-COOH \longrightarrow CH_2(OH)-CH(OH)-CHO$

Глицериновая кислота — Глицеральдегид

д) $CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2(OH) \longrightarrow CH_2(OH)-CO-CH_2(OH)$

Глицерол — Дигидроксиацетон

е) $C_6H_5-CH_3 \longrightarrow C_6H_5-COOH$

Толуол — Бензойная кислота

$$CH_3-CHO + H-H \underset{\text{Окисление}}{\overset{\text{Восстановление}}{\rightleftharpoons}} [CH_3-CH(O\text{–}H)\text{–}H] \underset{\text{Окисление}}{\overset{\text{Восстановление}}{\rightleftharpoons}} CH_3-CH_2-OH \quad (1)$$

Ацетальдегид — Этанол

$$CH_3-COOH + H-H \underset{\text{Окисление}}{\overset{\text{Восстановление}}{\rightleftharpoons}} [CH_3-C(O)\cdots O-H \;\; H\text{–}H] \underset{\text{Окисление}}{\overset{\text{Восстановление}}{\rightleftharpoons}} CH_3-CHO + H_2O \quad (2)$$

Уксусная кислота — Ацетальдегид

Укажите, что́ именно происходит (окисление или восстановление) в каждом из приведенных ниже метаболических превращений. Напишите уравнения химического баланса, добавив H–H.

а) $CH_3-OH \longrightarrow H-CHO$

Метанол — Формальдегид

б) $H-CHO \longrightarrow H-COOH$

Формальдегид — Муравьиная кислота

в) $O=C=O \longrightarrow H-COOH$

Двуокись углерода — Муравьиная кислота

ж) $^-OOC-CH_2-CH_2-COO^- \longrightarrow {}^-OOC-CH=CH-COO^-$

Сукцинат — Фумарат

з) $CH_3-CO-COOH \longrightarrow CH_3-COOH + CO_2$

Пировиноградная кислота — Уксусная кислота

3. *Никотинамидные коферменты – переносчики водорода в обратимых окислительно-восстановительных реакциях* (гл. 10). Никотинамидные коферменты могут вступать в обратимые окислительно-восстановительные реакции со специфичными субстратами в присутствии соответствующих дегидрогеназ. В окислительно-

восстановительной реакции участвует никотинамидное кольцо кофермента; остальная часть его молекулы играет роль связывающей группы, которую узнает соответствующая дегидрогеназа. Формально источником водорода (H–H; см. п. 2) считается NADH + H^+. Когда кофермент окисляется, одновременно должен восстанавливаться субстрат:

$$\underset{\text{Окисл.}}{\text{Субстрат}} + \underset{\text{Восст.}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons \underset{\text{Восст.}}{\text{Субстрат}} + \underset{\text{Окисл.}}{NAD^+}$$

Укажите для каждой из приведенных ниже реакций, что́ происходит с субстратом, т.е. окисляется ли он, восстанавливается или степень его окисления остается неизменной (см. п. 2). Для тех реакций, в которых происходит окисление или восстановление субстрата, напишите уравнения химического баланса, указав требуемые количества NAD^+, NADH, H^+ и H_2O. Задача состоит в том, чтобы распознать, нужен ли для той или иной реакции окислительно-восстановительный кофермент.

а) $CH_3CH_2OH \longrightarrow CH_3{-}CHO$

Этанол → Ацетальдегид

б) $^{2-}O_3PO{-}CH_2{-}CH(OH){-}C(=O)OPO_3^{2-} \longrightarrow {}^{2-}O_3PO{-}CH_2{-}CH(OH){-}CHO + HPO_4^{2-}$

3-фосфоглицероилфосфат → Глицеральдегид-3-фосфат

в) $CH_3{-}CO{-}COO^- \longrightarrow CH_3{-}CHO + CO_2$

Пируват → Ацетальдегид

г) $CH_3{-}CO{-}COO^- \longrightarrow CH_3{-}COO^- + CO_2$

Пируват → Ацетат

д) $^-OOC{-}CH_2{-}CO{-}COO^- \longrightarrow {}^-OOC{-}CH_2{-}CH(OH){-}COO^-$

Оксалоацетат → Малат

е) $CH_3{-}CO{-}CH_2{-}COO^- + H^+ \longrightarrow CH_3{-}CO{-}CH_3 + CO_2$

Ацетоацетат → Ацетон

4. *Стимулирование потребления кислорода оксалоацетатом и малатом.* В начале 30-х годов Альберт Сент-Дьёрдьи сообщил об интересном наблюдении. Он добавлял к дышащим суспензиям измельченной грудной мышцы голубя оксалоацетат или малат и обнаружил, что потребление кислорода при этом усиливается. При измерении количества потребляемого кислорода было выявлено одно удивительное обстоятельство: количество потребленного кислорода в 7 раз превышало то, какое требовалось для полного окисления добавленного оксалоацетата или малата до двуокиси углерода и воды.
   а) Почему добавление оксалоацетата или малата усиливает потребление кислорода?
   б) Почему количество поглощенного кислорода во много раз превышает то, которое требуется для полного окисления добавленного оксалоацетата или малата?

5. *Число молекул оксалоацетата в митохондрии.* В последней реакции цикла лимонной кислоты происходит дегидрирование малата, в результате чего регенерирует оксалоацетат, необходимый для взаимодействия с ацетил-СоА в цитратсинтазной реакции

$$\text{L-малат} + NAD^+ \rightarrow \text{Оксалоацетат} + NADH + H^+$$
$$\Delta G^{0\prime} = +7{,}1 \text{ ккал/моль.}$$

   а) Вычислите константу равновесия для этой реакции при 25°С.
   б) Поскольку величина $\Delta G^{0\prime}$ относится к стандартному значению pH, т.е. pH 7, константа равновесия, вычисленная, как в п. «а», равна

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Оксалоацетат}][NADH]}{[\text{L-малат}][NAD^+]}.$$

Как показывают измерения, концен-

трация L-малата в митохондриях печени крысы составляет приблизительно 0,20 мМ, а отношение концентраций $NAD^+/NADH$ равно 10. Вычислите концентрацию оксалоацетата в митохондриях печени крысы при pH 7.

в) Митохондрии из печени крысы имеют форму шариков диаметром около 2 мкм. Чтобы правильно оценить концентрацию оксалоацетата в митохондриях, определите число его молекул, приходящееся на одну митохондрию.

6. *Изучение процесса дыхания в изолированных митохондриях.* Можно изучать клеточное дыхание на препаратах изолированных митохондрий, наблюдая за тем, как изменяется поглощение кислорода этими препаратами в зависимости от условий. Если к активно дышащим митохондриям, использующим в качестве единственного источника «топлива» пируват, добавить 0,01 М малонат натрия, то дыхание внезапно прекращается и накапливается один из промежуточных продуктов метаболизма.
   а) Какова структура накапливающегося промежуточного продукта?
   б) Почему он накапливается?
   в) Почему прекращается потребление кислорода?
   г) Каким способом (кроме простого удаления малоната) можно снять вызванное малонатом ингибирование? Поясните свой ответ.

7. *Опыты с мечеными соединениями на препаратах изолированных митохондрий.* Метаболические пути, на которых совершаются превращения тех или иных органических соединений, часто изучают, используя меченые субстраты и прослеживая судьбу метки.
   а) Как определить, действительно ли глюкоза, добавленная к суспензии изолированных митохондрий, расщепляется до CO_2 и H_2O?
   б) К препарату митохондрий добавили пируват, меченный ^{14}C по метильной группе. Какое положение займет ^{14}C в оксалоацетате после одного оборота цикла лимонной кислоты? Аргументируйте свой ответ, проследив судьбу метки на всем протяжении цикла.
   в) Сколько оборотов цикла лимонной кислоты потребуется для того, чтобы весь ^{14}C выделился в виде $^{14}CO_2$? Аргументируйте свой ответ.

8. *Катаболизм 1-^{14}С-глюкозы.* Активно дышащую бактериальную культуру в течение короткого времени инкубировали с 1-^{14}С-глюкозой, а затем выделили из нее промежуточные продукты гликолиза и цикла лимонной кислоты. Эти промежуточные продукты перечислены ниже. Укажите, какое положение занимает в каждом из них ^{14}C. Учитывайте при этом только начальное включение ^{14}C в молекулу.
   а) Фруктозо-1,6-дифосфат
   б) Глицеральдегид-3-фосфат
   в) Фосфоенолпируват
   г) Ацетил-СоА
   д) Цитрат
   е) α-Кетоглутарат
   ж) Оксалоацетат

9. *Синтез оксалоацетата в цикле лимонной кислоты.* Оксалоацетат образуется на последней стадии цикла лимонной кислоты в результате NAD^+-зависимого окисления L-малата. Возможен ли синтез оксалоацетата из ацетил-СоА под действием одних только ферментов и кофакторов цикла лимонной кислоты, без траты промежуточных продуктов цикла? Дайте подробный ответ. Как пополняется запас оксалоацетата?

10. *Механизм действия фторацетата, применяемого в качестве родентицида.* Препарат фторацетата, изготовляемого промышленным способом, применяется как средство борьбы с грызунами. В природе фторацетат обнаружен в одном из южноафриканских растений. Проникнув в клетки, он превращается во фторацетил-СоА в реакции, катализируемой ферментом ацетаттиокиназой

$$\mathrm{F{-}CH_2COO^- + CoA\text{-}SH + ATP \longrightarrow F{-}CH_2\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}S{-}CoA + AMP + PP_i}$$

Для изучения токсического действия фторацетата был проведен эксперимент на интактном изолированном сердце крысы. После перфузии сердца 0,22 мМ фторацетатом уменьшалось поглощение глюкозы и снижалась скорость гликолиза, а глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат накапливались. Концентрации всех промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты были при этом ниже нормы, и только концентрация цитрата превышала норму в 10 раз.
   а) В какой точке блокируется цикл ли-

монной кислоты? Почему цитрат накапливается, а запас других промежуточных продуктов цикла истощается?

б) Фторацетил-СоА подвергается ферментативным превращениям в цикле лимонной кислоты. Какова структура конечного продукта обмена фторацетата? Почему он блокирует цикл лимонной кислоты? Как можно снять это ингибирование?

в) Почему после перфузии сердца фторацетатом уменьшается поглощение глюкозы и снижается скорость гликолиза? В чем причина накопления монофосфатов?

г) Почему отравление фторацетатом смертельно?

11. *Синтез α-кетоглутарата.* α-Кетоглутарат играет центральную роль в биосинтезе ряда аминокислот. Предложите последовательность известных ферментативных реакций, результатом которой будет реальный синтез α-кетоглутарата из пирувата. Эти реакции не должны предусматривать потребления каких-либо промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты. Напишите суммарное уравнение для предложенной вами последовательности реакций и укажите источник каждого реагирующего вещества.

12. *Глиоксилатный цикл в семенах растений.* Животные не могут синтезировать углеводы из жиров, потому что они не способны превращать ацетил-СоА (продукт расщепления жирных кислот) в пируват или оксалоацетат (соединения, необходимые для биосинтеза глюкозы). В случае же растений и некоторых микроорганизмов дело обстоит иначе. Благодаря имеющимся у них ферментам, изоцитрат-лиазе и малат-синтазе (рис. 16-18), они могут синтезировать оксалоацетат из ацетил-СоА в глиоксилатном цикле. В семенах высших растений содержатся большие количества масел, которые при прорастании служат источником жирных кислот, используемых в качестве предшественников для синтеза целлюлозы на ранних стадиях развития, когда синтетический аппарат еще не сформировался. Напишите уравнения известных ферментативных реакций, последовательность которых обеспечивала бы реальный синтез оксалоацетата, используемого для биосинтеза глюкозы, из ацетил-СоА. Ваша схема не должна предусматривать потребления какого-либо промежуточного продукта цикла лимонной кислоты. Напишите суммарное уравнение образования оксалоацетата из ацетил-СоА. Укажите источники всех кофакторов.

13. *Катаболизм глюкозы. Гликолиз и пентозофосфатный путь.* Изотопные методы дают возможность определить, какая часть катаболизма глюкозы в данной клетке или в данной ткани идет по гликолитическому, а какая – по пентозофосфатному пути. Клетки делят на две порции: одну инкубируют с 1-^{14}C-глюкозой, а другую – с 6-^{14}C-глюкозой. После этого сравнивают начальные скорости появления ^{14}C в CO_2, образующейся в результате окисления глюкозы, у этих двух вариантов. Объясните, в чем заключается химический смысл такого подхода. Какими должны быть относительные начальные скорости образования $^{14}CO_2$ в клетках печени, если исходить из того, что катаболизм глюкозы распределен поровну между гликолитическим и пентозофосфатным путями?

ГЛАВА 17

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ, ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА АТР

В этой главе мы познакомимся с событиями, составляющими кульминацию клеточного дыхания,–с переносом электронов и окислительным фосфорилированием. Все ферментативные этапы окислительного расщепления углеводов, жиров и аминокислот сходятся в аэробных клетках к этой конечной стадии клеточного дыхания, на которой электроны переходят от органических субстратов к кислороду, а энергия, выделяемая при этом, используется для образования АТР из ADP и фосфата.

Представление о значении процесса окислительного фосфорилирования в организме человека может дать следующий грубый расчет. Взрослый здоровый человек весом 70 кг при сидячей работе потребляет в день около 2800 ккал. Для того чтобы такое количество энергии было получено за счет гидролиза АТР, требуется (в стандартных условиях) 2800/7,3 = 384 моль, или 190 кг АТР. Между тем в организме человека содержится всего около 50 г АТР. Ясно поэтому, что для удовлетворения потребности организма в химической энергии эти 50 г АТР должны на протяжении суток тысячи и тысячи раз расщепиться до ADP и фосфата с последующим ресинтезом. Кроме того, должна, очевидно, в широких пределах меняться и сама скорость обновления АТР в организме–от минимальной во время сна до максимальной в периоды напряженной мышечной работы. А это значит, что окислительное фосфорилирование–не просто непрерывный жизненно важный процесс, но и такой, который должен регулироваться в очень широких пределах.

17.1. Перенос электронов от субстратов на кислород служит источником энергии АТР

На рис. 17-1 приведена схема, помогающая понять общую организацию процесса переноса электронов и окислительного фосфорилирования. В каждом обороте цикла лимонной кислоты специфичные дегидрогеназы отщепляют от изоцитрата, α-кетоглутарата, сукцината и малата четыре пары атомов водорода. Эти атомы водорода в определенной точке отдают свои электроны в цепь переноса электронов и превращаются таким образом в ионы H^+, которые поступают в водную среду. Электроны, переходя от одного переносчика к другому, достигают в конце концов *цитохрома* aa_3, или *цитохромоксидазы*, при участии которой они и передаются на кислород–конечный акцептор электронов у аэробных организмов. Всякий раз, когда атом кислорода присоединяет два электрона, поступающие к нему по цепи переноса, из водной среды поглощаются два иона H^+, равноценные тем, в которые превратились два атома водорода, отщепленные ранее дегидрогеназами; в результате этого образуется молекула H_2O.

Из рис. 17-1 видно, что помимо четырех пар атомов водорода, поставляемых

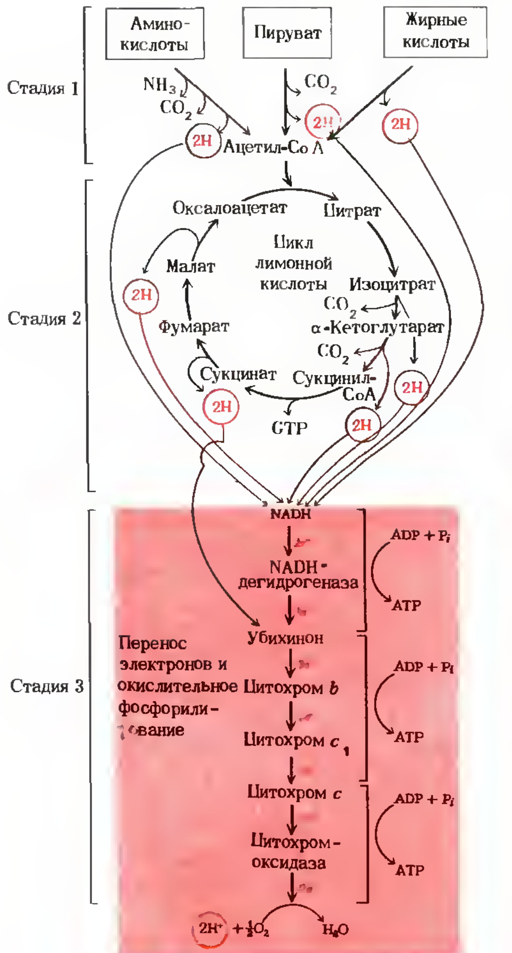


Рис. 17-1. Схема процесса дыхания. Указано происхождение пар водородных атомов, отщепляемых дегидрогеназами. Эти пары водородных атомов передают свои электроны ($2e^-$) в цепь переноса электронов, по которой они в конечном счете переходят на кислород. Для восстановления каждого атома кислорода требуется $2e^-$ + $2H^+$. Энергия, высвобождающаяся при переносе одной пары электронов от NADH к кислороду, запасается в виде трех молекул ATP, образующихся в результате окислительного фосфорилирования. Цепь переноса электронов представлена здесь не полностью.

каждым оборотом цикла лимонной кислоты, образуются и другие атомы водорода, отщепляемые дегидрогеназами от пирувата, жирных кислот и аминокислот во время расщепления этих соединений до ацетил-СоА и других продуктов. Почти все атомы водорода, отщепляемые дегидрогеназами от молекул клеточного топлива в аэробных клетках, в конце концов передают свои электроны в дыхательную цепь, т.е. на тот общий путь, который ведет к конечному акцептору электронов – кислороду.

Дыхательная цепь состоит из ряда белков с прочно присоединенными простетическими группами, обладающими способностью присоединять и отдавать электроны. Эти белки располагаются в определенной последовательности, в которой каждый из них способен присоединять электроны от предыдущего и передавать их тому, который следует за ним. Электроны, поступающие в эту цепь переносчиков, богаты энергией, но по мере их продвижения по цепи, от одного переносчика к другому, они теряют свободную энергию. Значительная часть этой энергии запасается в форме ATP с помощью молекулярных механизмов, действующих во внутренней мембране митохондрий. Перенос электронов сопряжен с синтезом ATP из ADP и фосфата: на каждую пару электронов, переданных по дыхательной цепи от NADH к кислороду, синтезируются три молекулы ATP (рис. 17-1). Три участка дыхательной цепи, в которых энергия, высвобождающаяся в процессе окисления—восстановления, запасается в форме ATP, называются *пунктами фосфорилирования* или *пунктами запасания энергии*.

17.2. Перенос электронов и окислительное фосфорилирование происходят во внутренней митохондриальной мембране

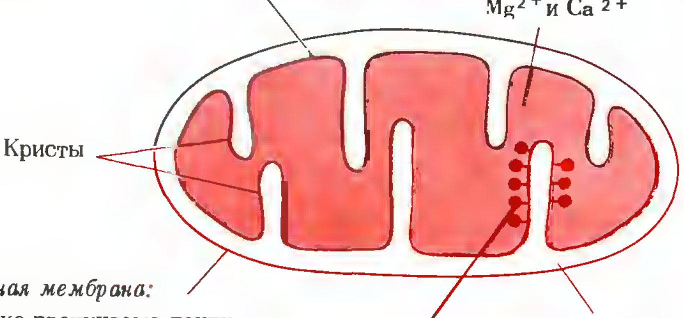
В эукариотических клетках почти все специфичные дегидрогеназы, принимающие участие в окислении пирувата и другого клеточного топлива через цикл лимонной кислоты, находятся во внутреннем компартменте митохондрий – в их *матриксе* (рис. 17-2). Во внутренней митохондриальной мембране локализуются переносчики электронов, составляющие дыхательную цепь, и ферменты, катализирующие синтез ATP из ADP и фосфата. Молекулы, играющие роль

Внутренняя мембрана:

Содержит цепи переноса электронов, сукцинатдегидрогеназу, АТР-синтезирующие ферменты и различные мембранные транспортные системы. Для большинства ионов небольшого размера она непроницаема

Матрикс:

Содержит большую часть ферментов цикла лимонной кислоты, пируват-дегидрогеназную систему, систему окисления жирных кислот и многие другие ферменты. Он содержит также ATP, ADP, AMP, фосфат, NAD, NADP и кофермент А. Здесь же присутствует K^+, Mg^{2+} и Ca^{2+}

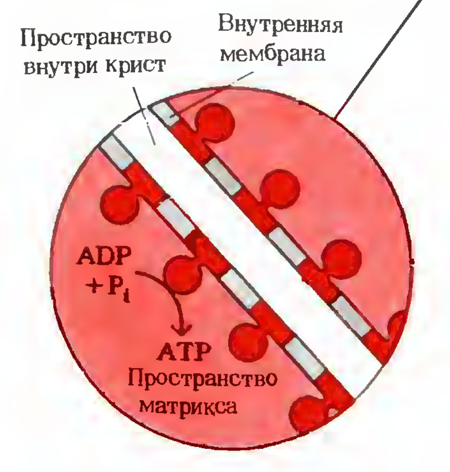


Наружная мембрана:

Легко проницаема почти для всех молекул и ионов небольшого размера. Так же, как и внутренняя мембрана, она содержит некоторые ферменты

Межмембранное пространство:

Здесь находятся аденилаткиназа и другие ферменты



Молекулы ATP-синтетазы:

Их основания находятся во внутренней мембране. ATP синтезируется в матриксе

Рис. 17-2. Биохимическая анатомия митохондрий. Указана локализация ферментов цикла лимоиной кислоты, цепей переноса электронов, ферментов, катализирующих окислительное фосфорилирование, и внутреннего пула коферментов. Во внутренией мембране одной митохондрии печени может находиться свыше 10000 наборов цепей переноса электронов и ATP-синтетазных молекул. Число таких наборов тем больше, чем больше площадь поверхности внутренней мембраны. Митохондрии сердца с их многочисленными кристами содержат в 3 раза больше таких наборов, чем митохондрии печени. Внутренннй пул коферментов и промежуточных продуктов функционально изолирован от соответствующего пула цитоплазмы. Подробно структура митохондрий описана в гл. 2.

топлива для цикла лимонной кислоты, такие, как пируват, должны попадать из цитозоля, т.е. из того места, где они образуются. в матрикс митохондрии, где им предстоит подвергнуться действию дегидрогеназ; при этом они, разумеется, должны пройти через обе митохондриальные мембраны. Точно так же и ADP, образовавшийся из ATP в цито-

золе в тех или иных процессах, требующих затраты энергии, должен попасть в митохондриальный матрикс, чтобы здесь рефосфорилироваться до АТР. Новообразованный АТР должен затем снова перейти в цитозоль. Во внутренней митохондриальной мембране имеются специальные транспортные системы (разд. 17.19), которые переносят из цитозоля в митохондрии пируват и другое клеточное топливо, а также обеспечивают в процессе окислительного фосфорилирования поступление ADP и фосфата в митохондрии и выход АТР в цитозоль. Таким образом, внутренняя мембрана митохондрий состоит из многих компонентов. В нее входят переносчики электронов, ряд ферментов и некоторые мембранные транспортные системы. На долю всех этих компонентов приходится в общей сложности до 75% или даже больше от общей массы мембраны; остальную часть составляют липиды. Внутренняя митохондриальная мембрана имеет сложную мозаичную структуру, от целостности которой зависит такая жизненно важная функция, как синтез АТР.

17.3. Реакции переноса электронов – это окислительно-восстановительные реакции

Выше мы рассматривали некоторые ферментативные реакции, в которых водородные атомы или электроны передаются от одной молекулы к другой. Теперь мы вновь займемся такими реакциями и рассмотрим отдельные их характеристики с количественной стороны. Химические реакции, в процессе которых происходит перенос электронов от одной молекулы к другой, называются *окислительно-восстановительными реакциями*. Соединения, отдающие электроны в такой реакции, называются *донорами электронов* или *восстановителями*, а соединения, присоединяющие электроны, – *акцепторами электронов* или *окислителями*.

Окислители и восстановители всегда функционируют как сопряженные *окислительно-восстановительные пары (редокс-пары)*, подобно тому как кислоты и основания функционируют как сопряженные кислотно-основные пары (разд. 4.8). Напомним, что кислотно-основные реакции описываются следующим общим уравнением:

$$\text{Донор протонов} \rightleftharpoons H^+ + \text{Акцептор протонов.}$$

Такое же общее уравнение можно написать и для окислительно-восстановительных реакций:

$$\text{Донор электронов} \rightleftharpoons e^- + \text{Акцептор электронов.}$$

Типичным примером окислительно-восстановительной реакции может служить реакция

$$Fe^{2+} \rightleftharpoons e^- + Fe^{3+},$$

в которой закисное железо (Fe^{2+}) играет роль донора электронов, а окисное (Fe^{3+})–роль акцептора. Вместе ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} представляют собой *сопряженную окислительно-восстановительную пару*.

Существует четыре способа передачи электронов от одной молекулы к другой.

1. Прямой перенос электронов. Например, окислительно-восстановительная пара Fe^{2+}–Fe^{3+} может передавать свои электроны паре Cu^+–Cu^{2+}

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cu^+.$$

2. Перенос в составе атомов водорода. Напомним, что атом водорода состоит из протона (H^+) и электрона (e^-). В этом случае общее уравнение имеет вид

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+,$$

где AH_2 – донор водорода (или электронов), А – акцептор водорода, а вместе они составляют сопряженную окислительно-восстановительную пару, способную восстанавливать акцептор электронов В путем переноса атомов водорода

$$AH_2 + B \rightarrow A + BH_2.$$

3. Перенос электронов от донора к акцептору в форме *гидрид-иона* (:H^-), несущего два электрона, как это имеет место в случае NAD-зависимых дегидрогеназ (разд. 10.6).

4. Перенос путем прямого взаимодействия органического восстановителя с кислородом, приводящего к образованию продукта, в котором содержится ковалентно связанный кислород. Примером такой реакции служит окисление углеводорода до спирта

$$R—CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R—CH_2—OH$$

В этой реакции донором электронов является углеводород, а атом кислорода играет роль акцептора.

Все эти четыре способа переноса электронов используются в живых клетках. Поэтому для обозначения одного электронного эквивалента, участвующего в окислении–восстановлении, часто пользуются нейтральным термином *восстановительный эквивалент*. Этот термин ничего не говорит нам о том, в какой форме совершается перенос электрона, т. е. что́ именно передается – сам электрон как таковой, водородный атом, гидрид-ион или же передача происходит в реакции с кислородом, приводящей к образованию окисленного продукта. Ниже мы увидим, что перенос электронов в митохондриях совершается в различной форме: переносятся гидрид-ионы, водородные атомы и, наконец, просто электроны (на последних стадиях, катализируемых цитохромами).

При ферментативном окислении молекул биологического топлива отщепляется обычно по два восстановительных эквивалента и каждый атом кислорода присоединяет к себе тоже два восстановительных эквивалента. Поэтому «единицей» биологического окисления принято считать перенос одной пары восстановительных эквивалентов от субстрата на кислород.

17.4. Каждая сопряженная окислительно-восстановительная пара характеризуется определенным стандартным потенциалом

Способность любой сопряженной кислотно-основной пары обратимо отдавать протон характеризуется константой диссоциации (разд. 4.8). Точно так же можно охарактеризовать количественно, при помощи константы, способность каждой сопряженной окислительно-восстановительной пары обратимо отдавать электрон. Эту способность выражают *стандартным окислительно-восстановительным потенциалом* E_0', величина которого по определению равна электродвижущей силе (э. д. с.) в вольтах, возникающей в *полуэлементе*, в котором донор электронов и сопряженный с ним акцептор электронов, присутствующие в концентрациях 1,0 М при 25°С и рН 7,0, находятся в равновесии с электродом, способным принимать электроны от донора и передавать их акцептору (рис. 17-3). Для того чтобы измерить величину э. д. с., возникающую в таком полуэлементе, его присоединяют к *стандартному полуэлементу*, э. д. с. которого известна (рис. 17-3). В качестве стандартного полуэлемента в настоящее время принят *водородный электрод*, э. д. с. которого при давлении газообразного H_2 1 атм, концентрации ионов H^+ 1,0 М (что соответствует рН 0) и температуре 25°С условно считают равной нулю. Скорригированный для рН 7,0 (т. е. для значения рН, принятого в качестве стандарта при биохимических расчетах) стандартный потенциал водородного электрода равен −0,41 В (рис. 17-3).

В биохимии для выражения стандартных потенциалов принято пользоваться понятием *восстановительный потенциал*. Чем более отрицательной величиной выражается восстановительный потенциал системы, тем выше ее способность отдавать электроны; и наоборот, чем более положительной величиной выражается восстановительный потенциал, тем выше способность системы присоединять электроны. Термины *стандартный восстановительный потенциал*, *стандартный потенциал* и *стандартный окислительно-восстановительный потенциал* равнозначны.

В табл. 17-1 приведены значения стандартных восстановительных потенциалов для некоторых сопряженных окислительно-восстановительных пар, играющих важную роль при переносе электро-

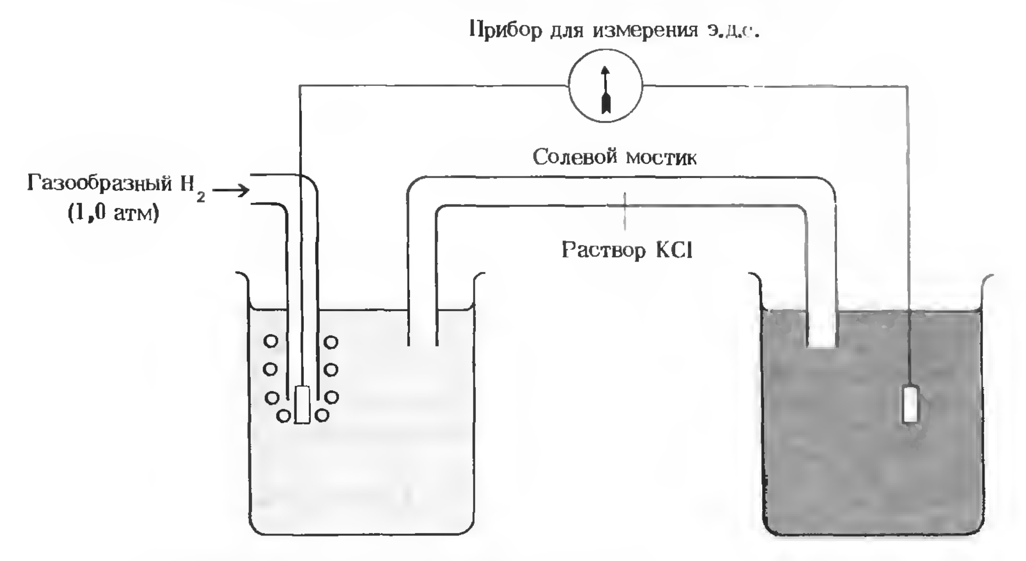


Рис. 17-3. Измерение стандартного восстановительного потенциала. В правый сосуд помещен раствор, содержащий смесь окисленной и восстановленной форм интересующей нас окислительно-восстановительной пары в концентрациях 1,0 М. В этот раствор погружен электрод (обычно платиновый), соединенный внешней цепью со стандартным полуэлементом (левый сосуд), содержащим окислительно-восстановительную пару, потенциал которой известен. В качестве абсолютного стандарта принят водородный электрод, представляющий собой платиновую пластинку, погруженную в раствор с 1,0 М H^+ (pH 0) и омываемую током газообразного H_2 при давлении 1,0 атм. Стандартный восстановительный потенциал водородного электрода считается равным нулю. Электроды могут присоединять или отдавать электроны окислительно-восстановительным парам в каждом полуэлементе в зависимости от относительной величины их потенциалов. Солевой мостик, содержащий насыщенный раствор KCl, осуществляет электрическое соединение между исследуемым и стандартным полуэлементами. Направление потока электронов во внешней цепи зависит от относительного «давления» электронов, или потенциала обоих элементов, но этот поток всегда направлен от элемента с более отрицательным потенциалом к элементу с более положительным потенциалом. По измеряемой э.д.с. и известной э.д.с. стандартного полуэлемента определяют э.д.с. полуэлемента, содержащего исследуемую окислительно-восстановительную пару.

нов в биологических системах. Они расположены в порядке возрастания потенциала, т.е. в порядке снижения способности отдавать электроны. Таким образом, сопряженные окислительно-восстановительные пары с относительно большей отрицательной величиной стандартного потенциала будут отдавать электроны парам, расположенным в этом перечне ниже, у которых стандартный потенциал выражается более положительной величиной. Например, у пары изоцитрат/α-кетоглутарат + + CO_2 при концентрациях компонентов 1,0 М стандартный потенциал E_0' равен −0,38 В. Поэтому в присутствии изоцитратдегидрогеназы (разд. 16.5) она будет отдавать свои электроны окислительно-восстановительной паре NADH/NAD$^+$, имеющей более положительный потенциал. Вместе с тем большая положительная величина стандартного потенциала окислительно-восстановительной пары вода/кислород (+0,82 В) указывает на то, что у этой пары способность отдавать электроны (т.е. способность образовывать молекулярный кислород) выражена очень слабо. Можно сформулировать это иначе, сказав, что у молекулярного кис-

Таблица 17-1. Стандартные восстановительные потенциалы E'_0 некоторых сопряженных окислительно-восстановительных пар, играющих важную роль в окислительном метаболизме[1)]

Окислительно-восстановительная пара	E'_0
Некоторые субстратные пары	
Ацетил-СоА + CO_2 + $2H^+$ + 2e → Пируват + СоА	−0,48
α-Кетоглутарат + CO_2 + $2H^+$ + $2e^-$ → Изоцитрат	−0,38
3-Фосфоглицероилфосфат + $2H^+$ + $2e^-$ → Глицеральдегид-3-фосфат + P_i	−0,29
Пируват + $2H^+$ + $2e^-$ → Лактат	−0,19
Оксалоацетат + $2H^+$ + $2e^-$ → Малат	−0,18
Фумарат + $2H^+$ + $2e^-$ → Сукцинат	+0,03
Компоненты цепи переноса электронов	
$2H^+$ + $2e^-$ → H_2	−0,41
NAD^+ + H^+ + $2e^-$ → NADH	−0,32
$NADP^+$ + H^+ + $2e^-$ → NADPH	−0,32
NADH-дегидрогеназа (FMN-форма) + $2H^+$ + $2e^-$ → NADH-дегидрогеназа ($FMNH_2$-форма)	−0,30
Убихинон + $2H^+$ + $2e^-$ → Убихинол	+0,04
Цитохром *b* (окисл.) + e^- → Цитохром *b* (восст.)	+0,07
Цитохром c_1 (окисл.) + e^- → Цитохром c_1 (восст.)	+0,23
Цитохром *c* (окисл.) + e^- → Цитохром *c* (восст.)	+0,25
Цитохром *a* (окисл.) + e^- → Цитохром *a* (восст.)	+0,29
Цитохром a_3 (окисл.) + e^- → Цитохром a_3 (восст.)	+0,55
$^1/_2 O_2$ + $2H^+$ + $2e^-$ → H_2O	+0,82

[1)] Приведены данные, рассчитанные для концентраций всех компонентов 1 М, pH 7,0 и температуры 25°С. Показаны протекающие в полуэлементе реакции, которые характеризуют сродство данной системы к электронам. Чем более отрицательной является величина E'_0, тем это сродство ниже; и наоборот, чем она более положительна, тем выше это сродство. Поэтому электроны будут стремиться переходить от одной окислительно-восстановительной пары к другой в направлении более положительного E'_0. Красным выделены потенциалы, занимающие особое, пограничное, положение, а именно потенциалы окислительно-восстановительных пар $H_2/2H^+$ и $H_2O/^1/_2O_2$.

лорода очень велико сродство к электронам или водородным атомам. Стандартные потенциалы следует выражать в *вольтах*, однако для удобства их часто указывают в *милливольтах*.

17.5. Перенос электронов сопровождается изменениями свободной энергии

Знание величин E'_0 различных окислительно-восстановительных пар позволяет предсказать направление потока электронов от одной окислительно-восстановительной пары к другой при стандартных условиях в присутствии катализатора. (Электроны обычно не переходят от одной окислительно-восстановительной пары к другой в отсутствие фермента или какого-нибудь катализатора, способного ускорять процесс; катализатор, однако, не изменяет направления потока и не влияет на положение равновесия.) В таких условиях электроны будут переходить от более электроотрицательной окислительно-восстановительной пары, например от $NADH/NAD^+$ ($E'_0 = -0,32$ В), к более электроположительным акцепторам электронов, например к паре восстановленный цитохром *c*/окисленный цитохром *c* ($E'_0 = +0,23$ В). В силу той же причины они будут переходить и от пары восстановленный цитохром *c*/окисленный цитохром *c* ($E'_0 = +0,23$ В) к паре вода/кислород ($E'_0 = +0,82$ В). Эта способность электронов переходить от электроотрицательных систем к электроположительным связана

с тем, что такой поток сопровождается уменьшением свободной энергии; поток электронов направлен всегда таким образом, чтобы в результате свободная энергия системы уменьшалась. Чем больше разность стандартных потенциалов двух окислительно-восстановительных пар, тем большим оказывается уменьшение свободной энергии при переносе электронов от электроотрицательной пары к электроположительной. Пройдя через всю цепь переносчиков электронов, от NADH ($E_0' = -32$ В) к кислороду ($E_0' = +0,82$ В), электроны теряют значительное количество свободной энергии, поскольку разность между стандартными потенциалами окислительно-восстановительных пар NADH/NAD$^+$ и $H_2O/^1/_2\,O_2$ относительно велика.

Определим теперь точно, чему равно количество свободной энергии, высвобождающейся при переносе двух электронов от NADH на кислород. Изменение стандартной свободной энергии в реакции, связанной с переносом электронов, вычисляют по формуле

$$\Delta G^{0\prime} = -nF\Delta E_0',$$

где $\Delta G^{0\prime}$ – изменение стандартной свободной энергии в калориях, n – число перенесенных электронов, F – константа, называемая числом Фарадея [23062 кал/(В·моль)], $\Delta E_0'$ – разность стандартных потенциалов электронодонорной и электроноакцепторной систем. Стандартные условия предполагают концентрации всех компонентов 1,0 М, температуру 25°С и pH 7,0. Таким образом, при переходе двух электронов от окислительно-восстановительной пары NADH/NAD$^+$ ($E_0' = -0,32$ В) к окислительно-восстановительной паре $H_2O/^1/_2\,O_2$ ($E_0' = +0,82$ В) изменение стандартной свободной энергии равно

$$\Delta G^{0\prime} = -2 \cdot 23062 \cdot [0,82 - (-0,32)] = -52,6 \text{ ккал}.$$

Этого количества энергии (52,6 ккал), высвобождающейся при переносе двух электронов в стандартных условиях от NADH на кислород, более чем достаточно для синтеза трех молекул АТР, который в стандартных условиях требует затраты $3 \cdot 7,3 = 21,9$ ккал.



Рис. 17-4. Направление потока электронов и энергетические соотношения в дыхательной цепи митохондрий. E–FMN означает NADH-дегидрогеназу; Q – убихинон; b, c_1, c, и a – цитохромы. Обратите внимание, что в дыхательной цепи имеется три участка (красные стрелки), в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии. Эти этапы поставляют свободную энергию для синтеза АТР. Значения E_0' для переносчиков электронов приведены в табл. 17-1.

С помощью той же формулы, $\Delta G^{0\prime} = -nF\Delta E_0'$, можно рассчитать изменение стандартной свободной энергии для любого отрезка цепи переноса электронов по разности между стандартными потенциалами двух окислительно-восстановительных пар – электронодонорной и электроноакцепторной. На рис. 17-4 показаны: 1) стандартные потенциалы некоторых переносчиков электронов дыхательной цепи, 2) направление потока электронов (поток неизменно направлен «вниз», т. е. к кислороду) и 3) относительные величины изменения свободной энергии на каждом из этапов. Обратите внимание, что в дыхательной цепи есть три участка, в которых перенос электронов сопровождается большим снижением свободной энергии. Это те участки, где высвобождающаяся энергия запасается, т. е. используется для синтеза АТР.

17.6. Цепь переноса электронов включает большое число переносчиков

В дыхательную цепь митохондрий входит большое число различных белков, осуществляющих в определенной последовательности перенос электронов от субстратов на кислород. На рис. 17-1 в составе дыхательной цепи показано только семь переносчиков электронов, но, как мы уже отмечали выше, это упрощенное ее изображение. В действительности в цепи переноса электронов имеется не менее 15 (а может быть, и больше) химических групп, способных присоединять и отдавать восстановительные эквиваленты в последовательности, показанной на рис. 17-5.

Обращает на себя внимание разнообразие химических групп, предназначенных для переноса электронов и всегда связанных с белком. Сюда входят: *никотинамидадениндинуклеотид* (NAD), действующий в составе различных дегидрогеназ; *флавинмононуклеотид* (FMN), связанный с NADH-дегидрогеназой; *убихинон*, или *кофермент* Q (жирорастворимый хинон с изопреноидной боковой цепью) – он может функционировать в соединении с одним или несколькими белками; железосодержащие белки двух разных типов: *железо-серные центры* (Fe-S) и *цитохромы*; и, наконец, *медь цитохрома* aa_3. Третье важное обстоятельство заключается в том, что все эти белки, играющие роль переносчиков электронов, нерастворимы в воде и все они «встроены» во внутреннюю мембрану митохондрий.

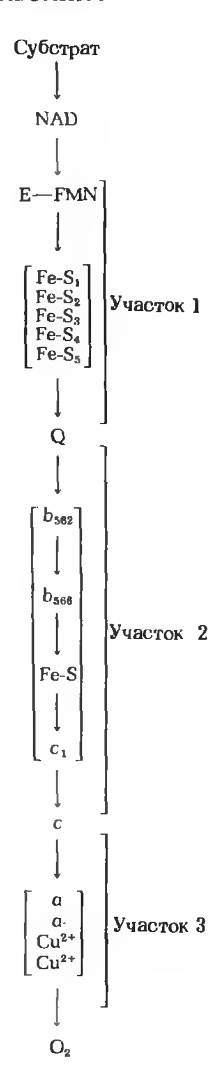


Рис. 17-5. Полный набор переносчиков электронов, входящих в состав дыхательной цепи. На участке 1 имеется не менее пяти различных железо-серных центров. Участок 2 включает две разные формы цитохрома *b* (с разными максимумами поглощения) и один железо-серный центр, отличный от тех, какие имеются на участке 1. Участок 3 содержит в дополнение к цитохромам *a* и a_3 еще и два иона меди. Ни точной последовательности, ни функции всех этих окислительно-восстановительных центров мы пока еще не знаем.

17.7. Пиридиновые нуклеотиды выполняют коллекторную функцию

Большинство электронных пар поступает в дыхательную цепь благодаря действию дегидрогеназ, использующих в качестве акцепторов электронов коферменты NAD^+ или $NADP^+$ (рис. 17-6). Всю эту группу в целом называют *NAD(P)-зависимыми дегидрогеназами*. Мы уже встречались с отдельными ее представителями, когда рассматривали процесс гликолиза и цикл лимонной кислоты. Существует, однако, еще и много других. Некоторые биологически важные реакции, катализируемые такими дегидрогеназами, приведены в табл. 17-2. Де-

Никотинамид

У NADP в этом положении находится фосфатная группа

А

NAD+ NADH

Б

Рис. 17-6. Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP). *А*. Окисленные формы (NAD^+ и $NADP^+$). Никотинамид (на красном фоне) представляет собой один из витаминов группы В (разд. 10.6); это та часть молекулы NAD, которая принимает участие в переносе электронов. *Б*. Восстановление никотинамидного кольца NAD^+ субстратом. Два восстановительных эквивалента переносятся от субстрата (обозначенного здесь RCH_2OH) на NAD^+ в форме гидрид-иона(:H^-). Второй водородный атом, отщепляемый от субстрата, превращается в ион H^+.

гидрогеназы катализируют обратимые реакции, которые в общем виде могут быть записаны следующим образом:

Восстановленный субстрат + NAD^+ $\rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons$ Окисленный субстрат + NADH + + H^+,

Восстановленный субстрат + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons$ Окисленный субстрат + NADPH + + H^+

Подавляющее большинство таких дегидрогеназ содержит NAD^+ (табл. 17-2). У некоторых, как, например, у *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (разд. 16.13), акцептором электронов служит $NADP^+$. И лишь совсем немногие, такие, как *глутаматдегидрогеназа*, способны взаимодействовать как с NAD^+, так и с $NADP^+$ (табл. 17-2). Часть пиридинзависимых дегидрогеназ локализована в цитозоле, часть – в митохондриях, а некоторые присутствуют и здесь, и там. Дегидрогеназы цитозоля способны взаимодействовать только с теми пиридиновыми нуклеотидами, которые находятся в цитозоле; сходным образом обстоит дело и с митохондриальными дегидрогеназами – обычно они взаимодействуют только с пиридиновыми нуклеотидами матрикса митохондрий. Цитозольный и митохондриальный пулы NAD и NADP отделены друг от друга митохондриальной мембраной, которая для этих коферментов непроницаема. Мы еще вернемся к этому вопросу.

Среди NAD-зависимых дегидрогеназ, участвующих в углеводном обмене, главную роль играют *глицеральдегидфосфатдегидрогеназа* и *лактатдегидрогеназа* гликолитической системы, локализующиеся в цитозоле, а также *пируватдегидрогеназа*, находящаяся в митохондриях (табл. 17-2). Три NAD-зависимые дегидрогеназы участвуют в митохондриях в цикле лимонной кислоты: *изоцитратдегидрогеназа*, *α-кетоглутаратдегидрогеназа* и *малатдегидрогеназа*. К числу других важных митохондриальных дегидрогеназ относятся: *3-гидроксиацил-СоА-де-*

Таблица 17-2. Некоторые важные реакции, катализируемые NAD(P)-зависимыми дегидрогеназами

	Локализация[1]
NAD-зависимые	
Изоцитрат + NAD^+ ⇌ α-Кетоглутарат + CO_2 + NADH + H^+	М
α-Кетоглутарат + CoA + NAD^+ ⇌ ⇌ Сукцинил-CoA + CO_2 + NADH + H^+	М
L-малат + NAD^+ ⇌ Оксалоацетат + NADH + H^+	М и Ц
Пируват + CoA + NAD^+ ⇌ Ацетил-CoA + CO_2 + NADH + H^+	М
Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + NAD^+ ⇌ 1,3-дифосфоглицерат + + NADH + H^+	Ц
Лактат + NAD^+ ⇌ Пируват + NADH + H^+	Ц
NADP-зависимые	
Изоцитрат + $NADP^+$ ⇌ α-Кетоглутарат + CO_2 + NADPH + H^+	М и Ц
Глюкозо-6-фосфат + $NADP^+$ ⇌ 6-фосфоглюконат + NADPH + H^+	Ц
NAD- или NADP-зависимые	
L-глутамат + H_2O + NAD^+ ($NADP^+$) ⇌ α-Кетоглутарат + NH_3 + + NADH (NADPH) + H^+	М

[1] М – митохондрии; Ц – цитозоль.

гидрогеназа, участвующая в цикле окисления жирных кислот, *β-гидроксибутиратдегидрогеназа* (гл. 18) и *глутаматдегидрогеназа*, функция которой связана с катаболизмом аминокислот (гл. 19).

Пиридинзависимые дегидрогеназы отщепляют от своих субстратов по два водородных атома. Один из них в виде гидрид-иона ($:H^-$) переносится на NAD^+ или $NADP^+$, а второй в виде иона H^+ переходит в среду. Каждый гидрид-ион несет два восстановительных эквивалента; один из них в форме водородного атома присоединяется к четвертому углеродному атому никотинамидного кольца, а второй в виде электрона передается азоту этого кольца (рис. 17-6).

Поскольку большая часть клеточных дегидрогеназ переносит водородные атомы от субстратов на NAD^+, можно сказать, что этот кофермент выполняет *коллекторную* функцию – собирает пары восстановительных эквивалентов, поступающие от разных субстратов, в одной молекулярной форме, в форме NADH (рис. 17-7). В конечном счете NAD^+ может собирать в этой форме также и восстановительные эквиваленты от субстратов, на которые действуют NADP-зависимые дегидрогеназы. Это оказывается возможным благодаря действию *пиридиннуклеотид-трансгидрогеназы* – сложного фермента, катализирующего реакцию

$$NADPH + NAD^+ \rightleftharpoons NADP^+ + NADH.$$

17.8. NADH-дегидрогеназа принимает электроны от NADH

На следующей стадии переноса электронов (рис. 17-5) пара восстановительных эквивалентов переносится от NADH к NADH-дегидрогеназе, находящейся во внутренней митохондриальной мембране. В этой реакции прочно связанная простетическая группа NADH-дегидрогеназы восстанавливается (рис. 17-8). Роль простетической группы NADH-дегидрогеназы играет *флавинмононуклеотид* (FMN), в состав которого входит молекула витамина B_2, или *рибофлавина* (разд. 10.5). NADH-дегидрогеназа принадлежит к классу *флавинзависимых дегидрогеназ*, или *флавопротеинов*. В результате переноса двух восстановительных эквивалентов от NADH на

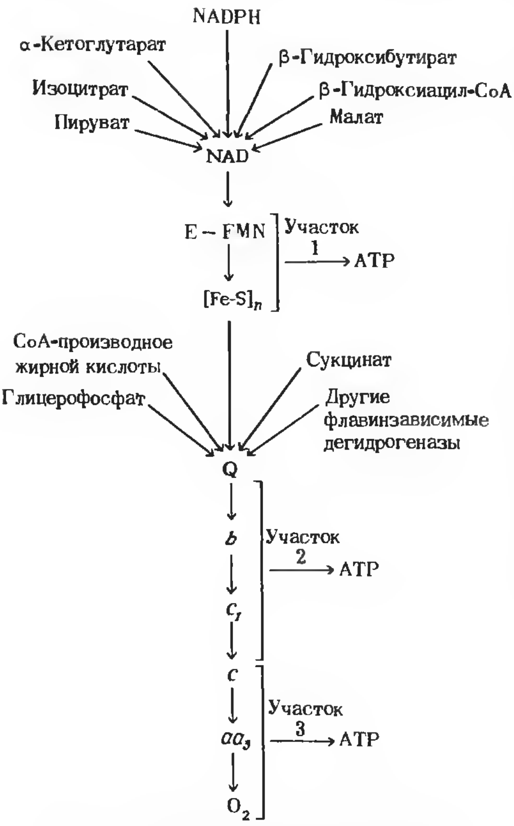


Рис. 17-7. Коллекторная функция NAD и убихинона (Q). NAD собирает восстановительные эквиваленты от многих NAD-зависимых субстратов, а также от NADPH. Убихинон собирает восстановительные эквиваленты от NADH-дегидрогеназы и от различных субстратов, на которые действуют другие флавинзависимые дегидрогеназы. Пары восстановительных эквивалентов, поставляемые большинством флавинзависимых дегидрогеназ, не проходят через первый пункт фосфорилирования, и поэтому за счет их энергии образуются только две молекулы ATP.

NADH-дегидрогеназу (обозначена здесь E–FMN) простетическая группа фермента FMN восстанавливается в $FMNH_2$:

$$NADH + H^+ + E\text{–}FMN \rightleftharpoons NAD^+ + E\text{–}FMNH_2.$$

В молекуле NADH-дегидрогеназы присутствует помимо флавиннуклеотидной простетической группы еще несколько атомов *негемового железа*. Эти атомы собраны в несколько групп, в которых они объединены с равным числом атомов кислотолабильной серы. Такие группы носят название *железо-серных центров* (рис. 17-9). Напомним, что железо-серные центры имеются также и в молекуле *сукцинатдегидрогеназы* (разд. 16.5,е). В [Fe(II)–Fe(III)]-циклах, связанных с изменением валентности, атомы железа железо-серных центров передают восстановительные эквиваленты от восстановленной простетической группы NADH-дегидрогеназы ($FMNH_2$) на следующий переносчик в дыхательной цепи, *убихинон*. Таким образом, этот комплекс, состоящий из NADH-дегидрогеназы и белков, содержащих железо и серу (его называют NADH: убихинон–оксидоредуктазой), включает электронпереносящие структуры двух типов: FMN и несколько железо-серных центров, которые действуют, очевидно, последовательно.

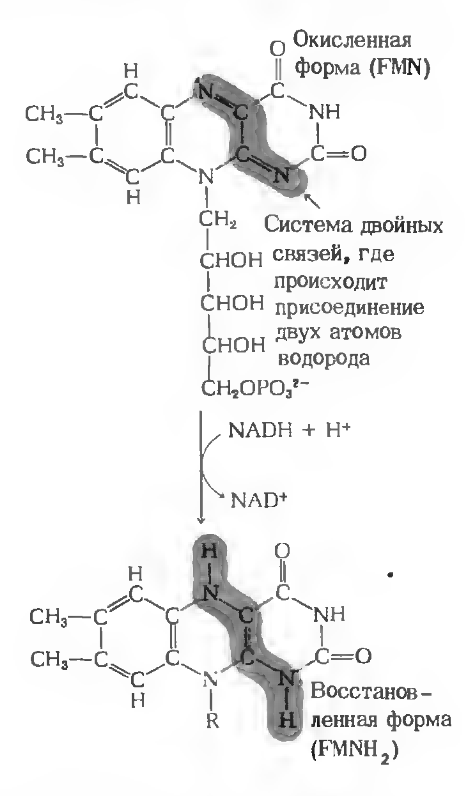


Рис. 17-8. Перенос восстановительных эквивалентов от NADH на флавинмононуклеотид (FMN) – простетическую группу NADH-дегидрогеназы. R означает здесь пятиуглеродную фосфорилированную боковую цепь.

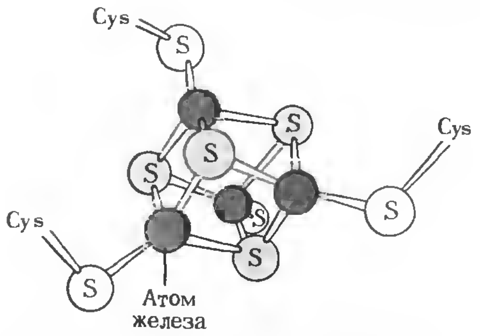


Рис. 17-9. Постулированное расположение атомов железа (красные кружки) и атомов серы (серые кружки) в железо-серных центрах. Число атомов железа и атомов кислотолабильной серы в этих центрах всегда одинаково, но есть центры, в которых содержатся только два атома железа, и есть такие, где их четыре. Здесь представлен железо-серный центр, содержащий четыре атома железа. Атомы серы на периферии принадлежат четырем остаткам цистеина в полипептидной цепи фермента.

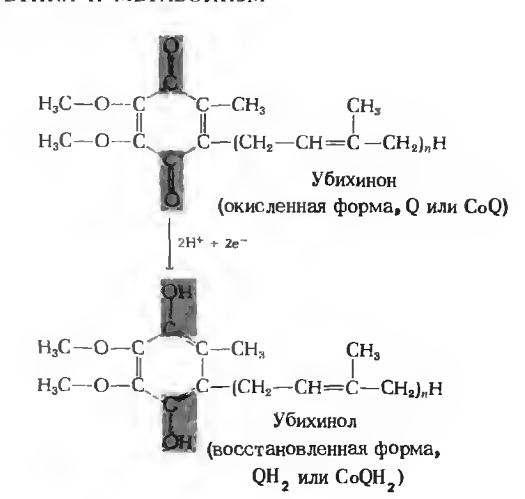


Рис. 17-10. Убихинон, или кофермент Q; *n* – число изопреновых звеньев в боковой цепи (см. текст). Группы, изображенные на красном фоне, участвуют в переносе атомов водорода. Обратите внимание, что при восстановлении убихинона в убихинол изменяется также и положение двойных связей в кольце.

17.9. Убихинон представляет собой жирорастворимый хинон

Роль следующего звена в цепи переносчиков восстановительных эквивалентов играет *убихинон*, или *кофермент Q* (по первой букве слова – quinone). Название «убихинон» отражает универсальное распространение этого кофермента: он найден практически во всех клетках. Убихинон – это жирорастворимый хинон с очень длинной изопреноидной боковой цепью (рис. 17-10). В большей части тканей млекопитающих присутствует убихинон с боковой цепью из десяти пятиуглеродных изопреновых звеньев; его обозначают Q_{10} или CoQ_{10}. В тканях других животных функционируют убихиноны, в боковой цепи которых имеется только шесть или восемь изопреновых звеньев (Q_6 или Q_8). Когда восстановительные эквиваленты переходят от восстановленной NADH-дегидрогеназы ($E\text{–}FMNH_2$) через железо-серные центры на убихинон, последний восстанавливается в убихинол, или QH_2 (рис. 17-10) с одновременной регенерацией окисленной формы NADH-дегидрогеназы:

$$E\text{–}FMNH_2 + Q \rightleftharpoons E\text{–}FMN + QH_2.$$

Молекулы убихинона, которые гораздо длиннее молекул фосфолипидов, присутствующих во внутренней мембране митохондрий, встречаются и в свободной форме, и в соединении с белком. Убихинон выполняет *коллекторную* функцию, собирая восстановительные эквиваленты не только от NADH-дегидрогеназы, но и от других флавинзависимых дегидрогеназ, находящихся в митохондриях (см. рис. 17-7), в частности от сукцинатдегидрогеназы и ацил-СоА-дегидрогеназы, участвующей в цикле окисления жирных кислот (гл. 18).

17.10. Цитохромы – это гемопротеины, осуществляющие перенос электронов

Цитохромами называются железосодержащие белки, окрашенные в красный или коричневый цвет. Действуя в определенной последовательности, они переносят электроны от убихинона на молекулярный кислород. Цитохромы принадлежат к классу *гемопротеинов*, молекулы которых содержат железо, входящее в состав железопорфириновой группы, или *гема*, напоминающего по своему строе-

нию простетическую группу гемоглобина (рис. 10-26). Цитохромы были открыты давно (сначала их назвали гистогематинами), но только в 1925 г. Дэвид Кейлин установил, что функция этих соединений связана с биологическим окислением. В летательных мышцах живых насекомых он обнаружил при помощи спектроскопа красно-коричневые пигменты. Оказалось, что спектр этих пигментов заметно менялся, когда насекомое, прикрепленное к предметному стеклу, делало резкие движения, пытаясь вырваться на свободу. Кейлин назвал эти пигменты цитохромами и высказал предположение, что они переносят электроны от пищевых веществ на кислород, претерпевая при этом окисление-восстановление. Существует три класса цитохромов: *a*, *b* и *c*, различающихся по спектрам поглощения. У каждого цитохрома в восстановленной (закисной) форме обнаруживаются три четкие полосы поглощения в видимой части спектра (рис. 17-11). Кейлин показал, что цитохромы действуют в определенной последовательности и что цитохром, стоящий последним

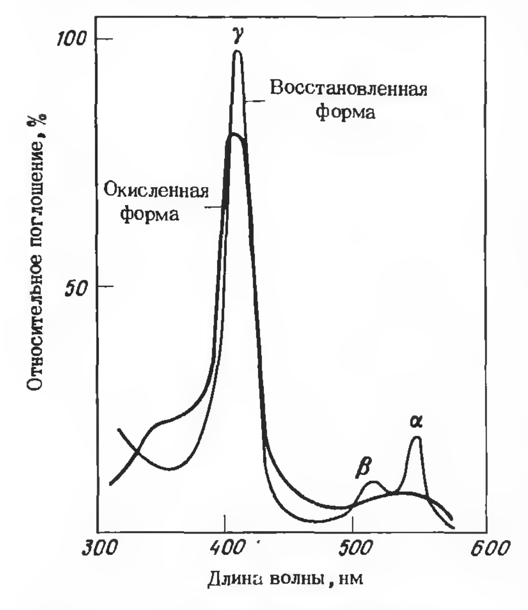


Рис. 17-11. Спектры поглощения цитохрома *c* в окисленной (красная линия) и восстановленной (черная линия) форме. Указаны характерные полосы поглощения восстановленной формы – α, β и γ.

в этом ряду, передает электроны на кислород.

Теперь мы знаем, что цитохромы в дыхательной цепи расположены в последовательности $b \to c_1 \to c \to aa_3$ (рис. 17-1 и 17-7). Цитохром *b*, присутствующий в двух формах, принимает электроны от убихинона и передает их цитохрому c_1, который в свою очередь передает их цитохрому *c*. Каждый из этих цитохромов, находясь в окисной [Fe(III)] форме, присоединяет один электрон и переходит в закисную [Fe(II)] форму. В переносе электронов от убихинона на цитохром *c* принимает участие также белок, содержащий железо и серу (рис. 17-5). Последним в ряду переносчиков электронов стоит цитохром aa_3, называемый также *цитохромоксидазой*, поскольку он переносит электроны прямо на кислород и тем самым завершает процесс переноса.

Лучше всего изучен среди цитохромов цитохром *c*. Это небольшой белок (мол. масса 12 500) с железопорфириновой группой, ковалентно присоединенной к единственной полипептидной цепи (разд. 8.4). Установлена аминокислотная последовательность белка (рис. 6-14) и выяснены все детали трехмерной структуры его молекул (рис. 8-5). Цитохром *c*, легко экстрагируемый из митохондрий, был получен в кристаллической форме из многих источников. Ранее мы уже упоминали (рис. 6-14), что цитохром *c*–один из белков, возникших на заре эволюции. На это указывает сходство многих участков его аминокислотной последовательности у всех эукариот: микроорганизмов, растений и животных.

Цитохром aa_3 отличается от других цитохромов. В его состав входят две молекулы прочно связанного гема А, отличающегося от протогема гемоглобина наличием у его порфиринового кольца длинной углеводородной боковой цепи. Кроме того, в нем имеются также два атома меди, играющие важную роль. Присоединив электроны, поступившие от цитохрома *c*, и перейдя таким образом в Fe(II)-форму, компонент *a* цитохрома aa_3 передает затем эти электроны цито-

хрому a_3. Восстановленный цитохром a_3 в свою очередь передает электроны на молекулярный кислород (O_2). В этом процессе вместе с двумя железопорфириновыми группами участвуют два связанных атома меди, что сопровождается обратимым изменением их валентности [Cu(I)–Cu(II)]. Этот сложный процесс является важным этапом переноса электронов, поскольку на этом этапе четыре электрона должны быть переданы почти одновременно на O_2 для того, чтобы образовались две молекулы H_2O (четыре H^+-иона, которые тоже для этого необходимы, поступают из водной среды). Из всех переносчиков цепи переноса электронов только цитохром aa_3 способен вступать непосредственно в реакцию с кислородом.

17.11. Неполное восстановление кислорода ведет к повреждению клеток

Для клетки очень важно, чтобы молекула кислорода, присоединив четыре электрона, полностью восстановилась до двух молекул H_2O. При неполном восстановлении кислорода в случае присоединения только двух электронов образуется перекись водорода (H_2O_2), а в случае присоединения одного электрона – *супероксидный радикал* ($:O_2^-$). И перекись водорода, и супероксид крайне токсичны для клеток, потому что они повреждают клеточные мембраны, взаимодействуя с остатками ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов. Аэробные клетки защищают себя от этого вредного действия супероксида и перекиси с помощью двух ферментов: *супероксиддисмутазы* (металлсодержащего фермента, превращающего супероксидный радикал в перекись водорода) и *каталазы* (превращающей перекись водорода в H_2O и молекулярный кислород)

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Супероксиддисмутаза}} H_2O_2 + O_2,$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Каталаза}} 2H_2O + O_2.$$

Токсичная перекись водорода находит, однако, своеобразное применение у жуков-бомбардиров. У этих жуков имеется особая железа, состоящая из двух отделов: в одном из них накапливается концентрированный раствор перекиси водорода, а в другом – раствор гидрохинона. Когда бомбардиру угрожает опасность, это удивительное насекомое отпугивает своего врага, выстреливая в него горячей (100°C) струей токсичного хинона, который образуется при мгновенном, «взрывном», окислении гидрохинона перекисью водорода.

17.12. Переносчики электронов действуют всегда в определенной последовательности

Какие факты свидетельствуют о том, что переносчики электронов в дыхательной цепи функционируют именно в указанной выше последовательности? Во-первых, именно в этой последовательности их стандартные окислительно-восстановительные потенциалы (рис. 14-7 и табл. 17-1) становятся все более положительными по мере приближения к кислороду, а этого и следует ожидать, поскольку электроны всегда стремятся переходить от электроотрицательных систем к электроположительным, что вызывает снижение свободной энергии. Во-вторых, каждое звено этой цепи специфично в отношении определенного донора и определенного акцептора электронов. И, наконец, в-третьих, из митохондриальной мембраны удалось выделить структурно обособленные комплексы функционально связанных между собой переносчиков электронов (рис. 17-12).

Комплекс I состоит из NADH-дегидрогеназы и ее железо-серных центров, функционирующих в тесной связи друг с другом. Комплекс II включает сукцинатдегидрогеназу и ее железо-серные центры. В комплекс III входят цитохромы *b* и *c* вместе с одним специфичным железо-серным центром. Комплекс IV

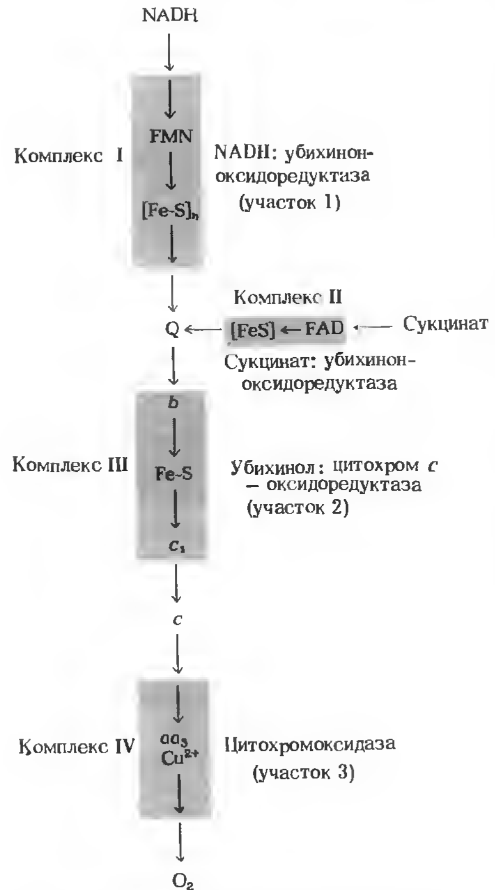


Рис. 17-12. Электронпереносящие комплексы. Они могут быть выделены в виде функциональных ансамблей.

состоит из цитохромов a и a_3. Убихинон служит связующим звеном между комплексами I, II и III, а цитохром c связывает между собой комплексы III и IV (рис. 17-12).

Изучению переноса электронов в немалой мере способствовал и такой метод, как применение специфических ингибиторов, блокирующих определенные этапы этого процесса. Среди них особо ценными оказались: 1) *ротенон*, блокирующий перенос электронов на участке от NADH до убихинона (это высокотоксичное вещество, добываемое из растений, употреблялось американскими индейцами в качестве яда для рыб), 2) токсичный антибиотик *антимицин A* (образуется одним из штаммов *Streptomyces*), блокирующий перенос электронов от убихинона на цитохром c, и 3) *цианид* – один из самых сильных ядов, блокирующий процесс восстановления кислорода, катализируемый цитохромом aa_3 (рис. 17-13). (Еще одним важным ингибитором цитохрома aa_3 является окись углерода.) При ингибировании цепи переноса электронов в определенной точке возникает *пункт перекреста*, как это видно из гидравлической модели, представленной на рис. 17-14. Переносчики электронов, стоящие в цепи непосредственно перед блокированным этапом, становятся более восстановленными, а стоящие после этого этапа – более окисленными. Такие изменения можно обнаружить при помощи спектрофотометра, поскольку у окисленных и у восстановленных форм переносчиков спектры поглощения различны.

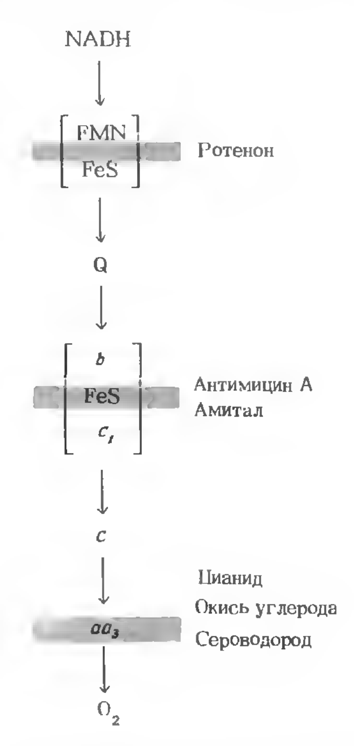


Рис. 17-13. Место действия различных ингибиторов, блокирующих перенос электронов. Амитал – лекарственный препарат из группы барбитуратов, применяемый в качестве снотворного. Мощными ингибиторами цитохромоксидазы являются, помимо цианида, также окись углерода и сероводород.

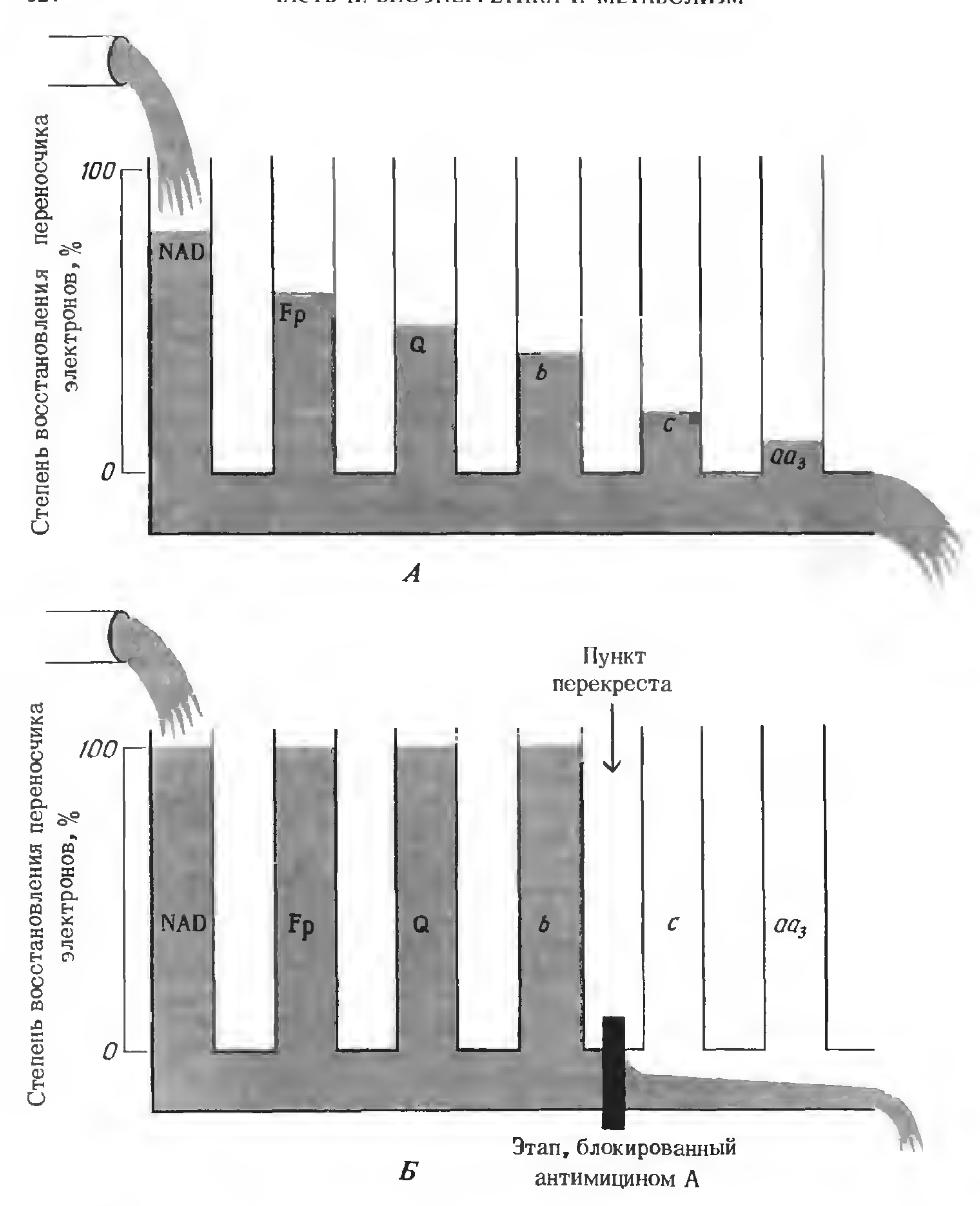


Рис. 17-14. Гидравлическая модель дыхательной цепи. *А*. В норме в дыхательной цепи поддерживается стационарное состояние. Степень восстановления последовательных переносчиков электронов в популяции митохондрий снижается при переносе электронов от субстратов на кислород. *Б*. Ингибитор переноса электронов антимицин А создает в дыхательной цепи пункт перекреста, в котором окислительно-восстановительное состояние переносчиков изменяется.

17.13. Энергия, выделяемая при переносе электронов, запасается в результате окислительного фосфорилирования

Выше мы уже отмечали, что в цепи переноса электронов есть три пункта, способных обеспечить энергией образование ATP из ADP и фосфата, т.е. процесс окислительного фосфорилирования

(рис. 17-4, 17-7 и 17-12). Пары электронов от NAD-зависимых дегидрогеназ проходят через все три пункта, что и дает в итоге максимальный возможный выход АТР – три молекулы. Суммарное уравнение для процесса переноса электронов от NADH к кислороду и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования имеет вид

$$NADH + H^+ + {}^1/_2O_2 + 3P_i + 3ADP \rightarrow NAD^+ + 3ATP + 4H_2O.$$

Однако, когда сукцинат окисляется под действием флавинзависимой сукцинатдегидрогеназы, на каждую пару электронов, переносимых на кислород, образуются только две молекулы АТР (рис. 17-7 и табл. 17-3). Объясняется это тем, что пара электронов, отщепляемая от сукцината, поступает в дыхательную цепь на уровне убихинона, минуя участок 1. Только по две молекулы АТР (рис. 17-7) дают также и электронные пары, отщепляемые другими флавинзависимыми дегидрогеназами, например ацил-СоА-дегидрогеназой, участвующей в цикле окисления жирных кислот (гл. 18). Окислительное фосфорилирование не ограничивается реакциями дегидрирования в одном только цикле лимонной кислоты; оно сопутствует переносу электронов, отщепляемых любыми дегидрогеназами, участвующими в катаболизме углеводов, жирных кислот и аминокислот.

Таблица 17-3. Число молекул АТР, образующихся на каждом из окислительных этапов цикла лимонной кислоты

Этап	Число образующихся молекул АТР
Изоцитрат → α-Кетоглутарат + CO_2	3
α-Кетоглутарат → Сукцинат + CO_2	4[1)]
Сукцинат → Фумарат	2
Малат → Оксалоацетат	3
Всего:	12

[1)] Поскольку в результате превращения сукцинил-СоА в сукцинат образуется GTP, а из него – АТР (разд. 16.5, д), этапы на пути, ведущем от α-кетоглутарата к сукцинату, дают в общей сложности четыре молекулы АТР.

В результате образования трех молекул АТР запасается довольно большая часть всей свободной энергии, выделяющейся при переносе электронов. Вспомним, что перенос одной пары электронов от NADH к кислороду дает 52,6 ккал. Поскольку на синтез одной молекулы АТР из ADP и фосфата расходуется в стандартных термодинамических условиях 7,3 ккал, нетрудно видеть, что теоретически в трех молекулах АТР может быть запасена значительная часть свободной энергии, высвобождающейся при переносе одной пары электронов от NADH на кислород. Теперь мы начинаем понимать, почему дыхательная цепь состоит из такого большого числа переносчиков электронов. Благодаря этому обстоятельству довольно большое снижение свободной энергии, которым сопровождается перенос одной пары электронов от NADH к кислороду, разбивается на ряд относительно небольших «порций», соответствующих отдельным этапам переноса. На трех таких этапах количество выделяющейся свободной энергии приблизительно совпадает со свободной энергией образования «энергетической валюты» клетки, т. е. АТР (рис. 17-4). Дыхательная цепь представляет собой, таким образом, своего рода каскад, при помощи которого клетка получает свободную энергию, извлекаемую из клеточного топлива, в «расфасованном» и, следовательно, удобном для использования виде.

17.14. Фермент, катализирующий синтез АТР, был выделен и реконструирован

Познакомимся теперь с АТР-синтезирующей ферментной системой, встроенной во внутреннюю мембрану митохондрий. Этот ферментный комплекс, получивший название *АТР-синтетазы* или *F_0F_1-АТРазы*, состоит из двух главных

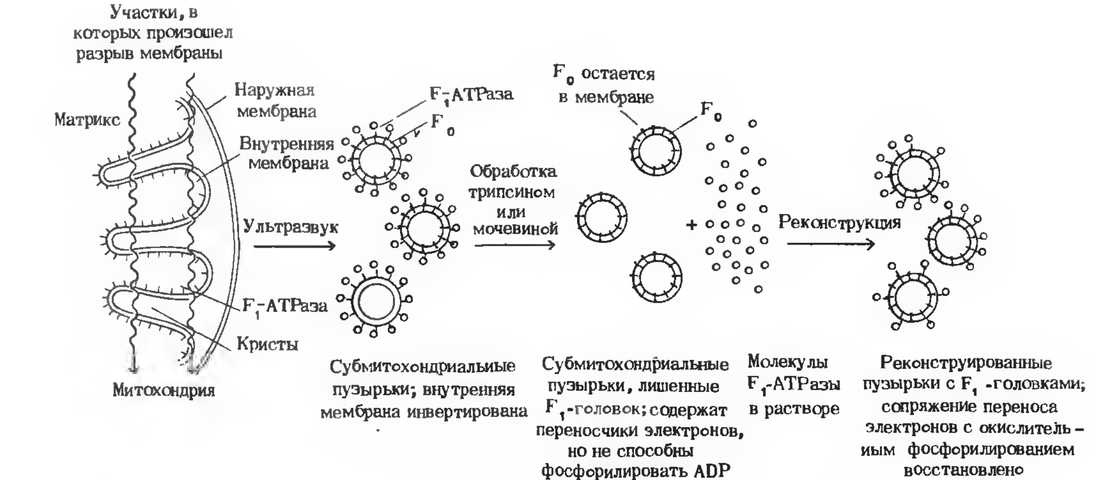


Рис. 17-15. Разрушение внутренней мембраны митохондрий ультразвуком, получение мембранных пузырьков, лишенных способности к окислительному фосфорилированию, и реконструирование структур, способных осуществлять этот процесс. Под действием ультразвука кристы внутренней митохондриальной мембраны разрушаются. Затем края мембранных фрагментов смыкаются и образуются замкнутые мембранные пузырьки, в которых головки грибовидных выростов, или F_1-головки, обращены не внутрь, а наружу. Если обработать эти инвертированные пузырьки мочевиной или трипсином, то F_1-головки от них отделятся. Обработанные таким способом пузырьки, все еще содержащие F_o-компоненты, сохраняют способность к переносу электронов, но уже не могут осуществлять фосфорилирование. Если теперь к таким потерявшим свои головки пузырькам добавить молекулы F_1, то эти молекулы вновь соединятся с F_o-единицами, сохранившимися в мембране пузырьков. В таких реконструированных пузырьках снова будут происходить оба процесса – и перенос электронов, и окислительное фосфорилирование.

компонентов: F_0 и F_1 (F от англ. «*factor*»). Компонент F_1 напоминает по форме круглую дверную ручку, обращенную в сторону матрикса митохондрии, или шляпку гриба (вследствие чего эти образования называют также грибовидными выростами; рис. 17-2 и 17-15). «Шляпка», чаще называемая головкой, с помощью ножки прикреплена к компоненту F_o, который встроен во внутреннюю мембрану и пронизывает ее насквозь (индекс «о» – это не нуль, а буква «о», указывающая на то, что эта часть молекулы АТР-синтетазы связывает токсичный антибиотик *олигомицин* – мощный ингибитор этого фермента, а следовательно, также и ингибитор окислительного фосфорилирования).

Первым выделили F_1 в очищенном виде из внутренней митохондриальной мембраны Эфраим Рэккер с сотрудниками. В изолированном виде компонент F_1 не обладает способностью синтезировать АТР из ADP и фосфата, но может расщеплять АТР на ADP и фосфат, из-за чего его называют также F_1-АТРазой. Если осторожно экстрагировать F_1 из инвертированных мембранных пузырьков, полученных путем разрушения внутренней митохондриальной мембраны (рис. 17-15), то дыхательные цепи в этих пузырьках оказываются ненарушенными; они способны осуществлять перенос электронов. Однако пузырьки, лишенные F_1 (отсутствие F_1-головок подтверждается электронной микроскопией), уже не способны синтезировать АТР. Если же к таким пузырькам в соответствующих условиях добавить изолированный F_1, то нормальная структура внутренней митохондриальной мембраны (непременным элементом которой являются F_1-головки) восстановится, а вместе с ней восстановится и энергетическое сопряжение между переносом электронов и синтезом АТР (рис. 17-15). Такого рода эксперименты с реконструкцией мембранной структуры, впервые

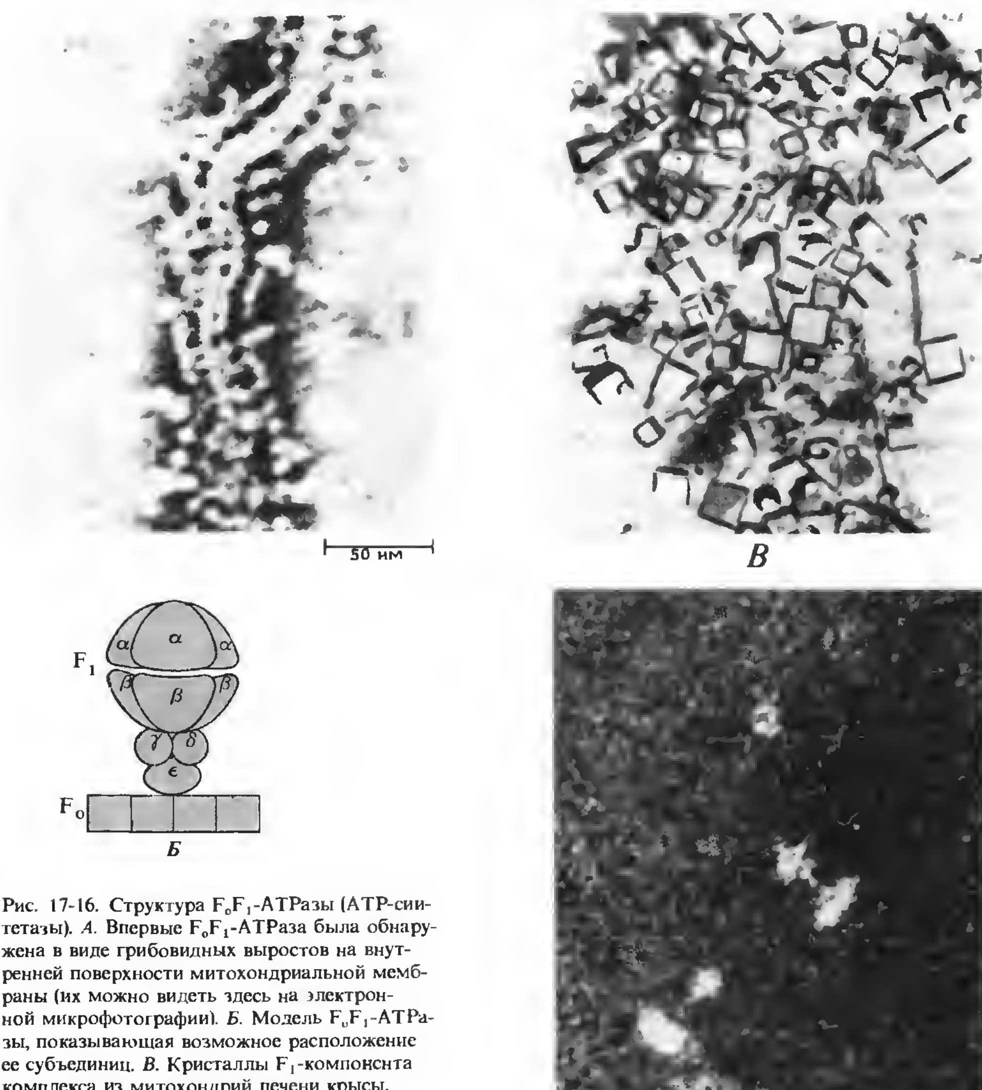


Рис. 17-16. Структура F_0F_1-АТРазы (АТР-синтетазы). *А*. Впервые F_0F_1-АТРаза была обнаружена в виде грибовидных выростов на внутренней поверхности митохондриальной мембраны (их можно видеть здесь на электронной микрофотографии). *Б*. Модель F_0F_1-АТРазы, показывающая возможное расположение ее субъединиц. *В*. Кристаллы F_1-компонента комплекса из митохондрий печени крысы. *Г*. Электронная микрофотография, на которой видны две молекулы F_0F_1-АТРазы, выделенной из митохондрий печени крысы.

проведенные Рэккером, положили начало широкому и плодотворному изучению структуры и функции мембран.

Позднее компонент F_1 был выделен в чистом кристаллическом виде (рис. 17-16). Его молекулярная масса равна приблизительно 380 000. Молекула F_1 состоит из девяти субъединиц пяти разных типов, сгруппированных вместе и содержащих несколько связывающих участков для АТР и ADP. Удалось также получить в высокоочищенном виде и F_0F_1-АТРазу. Электронно-микроскопическое изучение полной молекулы этого фермента при высоком разрешении показало, что она состоит из F_1-головки, ножки и основания, которое обычно заполняет всю толщу внутренней митохондриальной мембраны (рис. 17-16). F_0F_1-АТРазу назвали АТРазой, потому что в изолированном виде она катализирует расщепление АТР на ADP и P_i. Однако в интактных митохондриях главная ее биологическая функция заключается

не в расщеплении, а в синтезе АТР из ADP и P_i; поэтому правильнее было бы называть ее *АТР-синтетазой.*

17.15. Каким образом окислительно-восстановительная энергия переноса электронов передается АТР-синтетазе?

В предыдущих разделах этой главы мы рассмотрели процесс переноса электронов и познакомились со структурой АТР-синтетазы. Теперь пришло время задать главный вопрос: каким же образом цепь переноса электронов взаимодействует с АТР-синтетазой и как при этом происходит окислительное фосфорилирование ADP с образованием АТР? Это один из самых увлекательных и вместе с тем самых трудных вопросов в биохимии и цитологии. Хотя нам сегодня известно уже немало об утилизации энергии АТР в биосинтетических реакциях, тем не менее точные молекулярные механизмы генерирования АТР в процессе окислительного фосфорилирования остаются неясными. Одна из причин этого состоит в том, что ферменты переноса электронов и окислительного фосфорилирования очень сложны и к тому же встроены во внутреннюю мембрану митохондрий, чем сильно затрудняется изучение их взаимодействия. Постулировано три возможных механизма передачи энергии от процесса переноса электронов процессу синтеза АТР.

Гипотеза химического сопряжения предполагает, что перенос электронов сопряжен с синтезом АТР через определенную последовательность реакций; в ходе этих реакций некий высокоэнергетический ковалентный промежуточный продукт, образовавшийся в результате переноса электронов, расщепляется и отдает содержащуюся в нем энергию на образование АТР. Это предположение перекликается с уже известным нам примером участия 3-фосфоглицероилфосфата в качестве общего промежуточного продукта при синтезе АТР в процессе гликолиза (разд. 15.7, б).

Гипотеза конформационного сопряжения предполагает, что перенос электронов по дыхательной цепи вызывает конформационные изменения в белковых компонентах внутренней митохондриальной мембраны и тем самым переводит их в высокоэнергетическую форму. Конформационные изменения передаются молекуле F_oF_1-АТРазы и активируют ее. Релаксация активированной F_oF_1-АТРазы, т.е. ее возвращение к обычной конформации, высвобождает запасенную в ней энергию, которая используется для синтеза АТР и для отделения новосинтезированного АТР от молекулы фермента.

Хемиосмотическая гипотеза, сформулированная английским биохимиком Питером Митчеллом, исходит из совершенно иного, нового принципа. Постулируется, что перенос электронов сопровождается выкачиванием ионов H^+ из матрикса через внутреннюю митохондриальную мембрану в наружную водную среду. Вследствие этого между двумя сторонами внутренней митохондриальной мембраны возникает градиент концентрации ионов H^+ (трансмембранный градиент). Синтез АТР, требующий затраты энергии, осуществляется именно за счет осмотической энергии, присущей этому градиенту. Можно думать, что именно хемиосмотическая теория наиболее точно отражает организующий принцип окислительного фосфорилирования. Рассмотрим некоторые характерные особенности этого процесса, свидетельствующие в пользу хемиосмотической гипотезы.

а. Никакие «высокоэнергетические» промежуточные продукты, связывающие перенос электронов с синтезом АТР, не обнаружены

Многолетние интенсивные исследования, направленные на поиск таких гипотетических промежуточных продуктов, не дали результатов: обнаружить их не удалось.

б. Окислительное фосфорилирование требует целостности внутренней митохондриальной мембраны

Окислительное фосфорилирование может происходить лишь в том случае, если целостность внутренней митохондриальной мембраны не нарушена, т.е. если эта мембрана представляет собой полностью замкнутое образование. Любые разрывы и трещины во внутренней митохондриальной мембране лишают ее способности к окислительному фосфорилированию, хотя перенос электронов от субстрата к кислороду и в этих условиях может продолжаться.

в. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для ионов H^+, OH^-, K^+ и Cl^-

Это свойство мембраны также имеет отношение к окислительному фосфорилированию. Если мембрана повреждена или если она в результате какого-нибудь воздействия стала вдруг легко проницаемой для этих или для некоторых других ионов, то окислительное фосфорилирование происходить не будет. Эти наблюдения показывают, что разница в ионном составе или в концентрации между двумя сторонами внутренней митохондриальной мембраны играет важную роль в синтезе ATP.

Рис. 17-17. Действие типичного разобщающего агента 2,4-динитрофенола. При pH 7 этот агент существует главным образом в виде аниона, не обладающего способностью растворяться в липидах. В протонированной форме 2,4-динитрофенол растворим в липидах и потому может проходить сквозь мембрану, перенося с собой протон. По другую сторону мембраны перенесенный протон отщепляется. Действуя таким образом, разобщающие агенты препятствуют возникновению градиента концентрации ионов H^+ между двумя сторонами мембраны. Подобные разобщающие агенты, переносящие ионы H^+, называют протонофорами.

г. Окислительное фосфорилирование можно предотвратить с помощью разобщающих агентов

Некоторые химические вещества, например *2,4-динитрофенол* (рис. 17-17), подавляют фосфорилирование ADP до ATP, не влияя при этом на перенос электронов в митохондриях. Они разобщают перенос электронов и синтез ATP, разрушая необходимую связь между этими процессами. Такие вещества называются поэтому *разобщающими агентами*. В их присутствии свободная энергия, выделяемая при переносе электронов, переходит в тепло, а не запасается в виде ATP. Разобщающие агенты резко повышают проницаемость внутренней митохондриальной мембраны для ионов H^+. Это липофильные вещества, обладающие способностью связывать ионы H^+ по одну сторону мембраны и переносить их через мембрану на другую сторону, туда, где их концентрация ниже.

Одно время пытались использовать некоторые разобщающие агенты для борьбы с ожирением за счет понижения эффективности синтеза ATP. Оказалось, однако, что эти вещества крайне ток-

сичны, и потому от такого их применения пришлось отказаться.

д. Некоторые ионофоры также способны подавлять окислительное фосфорилирование

Ионофорами (т. е. «переносчиками ионов») называют жирорастворимые вещества, способные связывать определенные ионы и переносить их через мембрану. От разобщающих агентов они отличаются тем, что переносят через мембрану не ионы H^+, а какие-нибудь другие катионы. Например, токсичный антибиотик *валиномицин* (рис. 17-18) образует жирорастворимый комплекс с ионами K^+, легко проходящий через внутреннюю мембрану митохондрий, тогда как в отсутствие валиномицина ионы K^+ проникают сквозь нее с большим трудом. Ионофор *грамицидин* облегчает проникновение через мембрану не только K^+, но и Na^+, а также некоторых других одновалентных катионов. Таким образом, разобщающие агенты и ионофоры подавляют окислительное фосфорилирование, увеличивая проницаемость мембраны для ионов H^+, K^+ или Na^+.

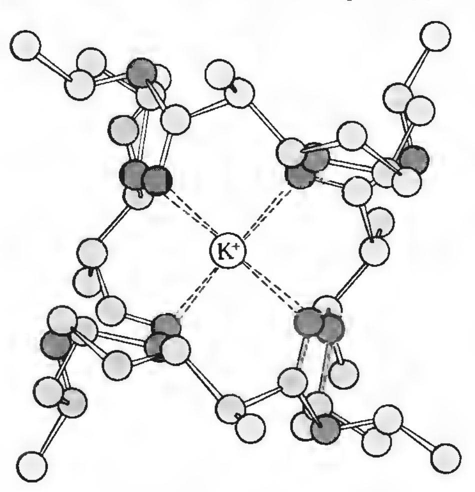


Рис. 17-18. Валиномицин – токсичный антибиотик, стимулирующий перенос ионов K^+ через мембрану. Этот ионофор, переносящий ионы K^+, состоит из остатков L- и D-валина, лактата и гидроксиизовалерата, соединенных в кольцеобразную структуру. Валиномицин образует специфический комплекс с ионом K^+ (показан красным цветом), который располагается в его гидрофильной внутренней части. Благодаря растворимой в липидах наружной части молекулы валиномицина (показана серым цветом) комплекс валиномицин—K^+ легко проходит через митохондриальную мембрану.

е. Поток электронов вынуждает ионы H^+ выходить из дышащих митохондрий наружу

Энергия, выделяемая при переносе электронов по дыхательной цепи от субстрата на кислород, может при определенных условиях вызвать перенос ионов H^+ из митохондриального матрикса в среду. В результате pH митохондриального матрикса повышается, а pH среды понижается, т. е. матрикс становится более щелочным, а среда, окружающая митохондрии, более кислой. Во внутренней митохондриальной мембране имеются, следовательно, какие-то «насосы» для ионов H^+; эти насосы используют свободную энергию потока электронов для перекачивания ионов H^+ наружу против градиента концентрации. Выкачивание ионов H^+ из митохондрий приводит к появлению мембранного электрического потенциала, потому что вследствие выхода этих ионов из матрикса в среду наружная сторона мембраны становится более электроположительной, а внутренняя – более электроотрицательной. Таким образом, перенос электронов создает электрохимический градиент ионов H^+, включающий два компонента; мембранный потенциал вносит больший вклад в энергию этого градиента:

$$\Delta\tilde{\mu}_H = \Delta\psi - Z\Delta pH$$

$\Delta\tilde{\mu}_H$	$\Delta\psi$	$Z\Delta pH$
Электрохимический H^+-градиент	Мембранный потенциал (внутренняя сторона мембраны имеет отрицательный электрический заряд)	Градиент pH (наружная сторона мембраны имеет более кислую реакцию)

В этом уравнении величина Z представляет собой коэффициент для перевода единиц pH в милливольты, т. е. в те единицы, в которых выражают обычно $\Delta\tilde{\mu}_H$ и $\Delta\psi$. Вклад мембранного потенциала со-

ставляет приблизительно 75% всего электрохимического H^+-градиента, создаваемого переносом электронов.

17.16. Согласно хемиосмотической гипотезе энергия переноса электронов передается на синтез ATP через протонный градиент

Именно те свойства митохондрий, которые мы только что рассмотрели, послужили основой для разработки хемиосмотической гипотезы (рис. 17-19). Согласно этой гипотезе, функция переноса электронов, происходящего во внутренней митохондриальной мембране, заключается в том, чтобы откачивать ионы H^+ из матрикса митохондрии в наружную среду и таким путем создавать между двумя водными фазами, которые разделяет эта мембрана, градиент концентрации ионов H^+ с более кислым значением pH снаружи. Такой градиент, при котором концентрация ионов H^+ снаружи выше, чем внутри митохондрии, обладает потенциальной энергией (разд. 14.16). Хемиосмотическая гипотеза постулирует далее, что ионы H^+, выведенные наружу за счет энергии переноса электронов, снова устремляются внутрь, в митохондриальный матрикс, через специальные каналы, или «поры», для этих ионов в молекулах F_0F_1-АТРазы. В этом случае они перемещаются по градиенту концентрации и во время их перехода через молекулы АТРазы выделяется свободная энергия. Именно эта энергия и служит движущей силой для сопряженного синтеза ATP из ADP и фосфата.

Итак, хемиосмотическая гипотеза не требует никакого высокоэнергетического химического агента, который в качестве общего промежуточного продукта обеспечивал бы сопряжение между переносом электронов и синтезом ATP. Переносчиком энергии, связывающим два эти процесса, служит, согласно хемиосмотической гипотезе, градиент концентрации ионов H^+ между двумя сторонами митохондриальной мембраны. В свете этой гипотезы становится понятным и требование целостности мембраны, т.е. полной ее замкнутости в интактных митохондриях или в мембранных пузырьках, образовавшихся из разрушенной внутренней мембраны (рис. 17-15); ясно, что без этой целостности градиент концентрации ионов H^+ между двумя сторонами мембраны попросту не мог бы существовать. Нетрудно видеть также, что

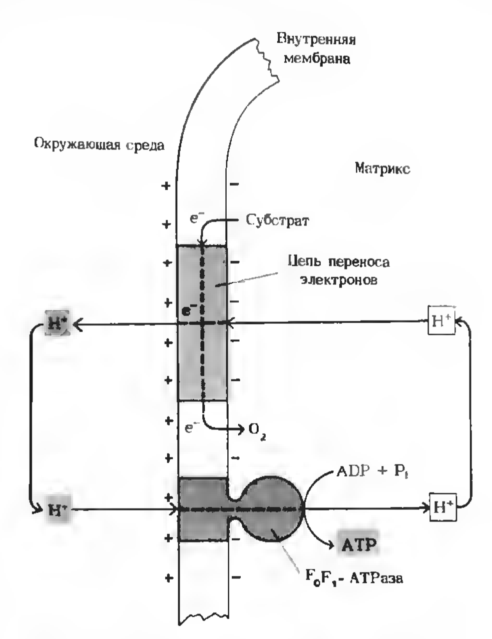


Рис. 17-19. Сопряжение переноса электронов с синтезом ATP в свете хемиосмотической гипотезы. Согласно этой гипотезе, цепь переноса электронов можно представить себе как насос, перекачивающий ионы H^+. Энергия, высвобождаемая при переносе электронов, используется для перемещения ионов H^+ из митохондриального матрикса наружу, что приводит к возникновению электрохимического H^+-градиента с более высокой концентрацией ионов H^+ в наружной водной фазе. Этот же процесс ведет к появлению трансмембранного электрического потенциала – наружная сторона мембраны оказывается электроположительной. Ионы H^+ из окружающей среды вновь устремляются внутрь, т.е. в митохондриальный матрикс, на этот раз по электрохимическому градиенту через молекулы F_0F_1-АТРазы. Этот переход ионов H^+ из зоны с более высокой в зону с более низкой их концентрацией сопровождается выделением свободной энергии, за счет которой и синтезируется ATP. Таким образом, хемиосмотическая гипотеза предполагает, что между митохондрией и окружающей ее средой совершается непрерывный круговорот ионов H^+, движущей силой которого является перенос электронов (см. дополнение 17-1).

при «утечке» ионов H^+ через мембрану в присутствии разобщающих агентов (рис. 17-17) H^+-градиент должен «разряжаться», т. е. энергетическое сопряжение должно ослабевать. Наконец, удалось показать, что выведение ионов H^+ из митохондрий во время переноса электронов и поглощение наружных ионов H^+ молекулами АТР-синтетазы сопоставимы по своей скорости с процессом окислительного фосфорилирования в интактных митохондриях.

Однако хотя хемиосмотическая гипотеза удовлетворительно объясняет бо́льшую часть особенностей окислительного фосфорилирования, есть и такие стороны этого процесса, которые все еще остаются неясными. Загадочным остается, в частности, механизм, с помощью которого цепь переноса электронов «откачивает» ионы H^+ из матрикса митохондрий наружу (дополнение 17-1).

Дополнение 17-1. Многое в механизме окислительного фосфорилирования остается еще неясным

Хотя хемиосмотическая гипотеза получила широкое признание в той своей части, которая касается главного организующего принципа передачи энергии от процесса переноса электронов к синтезу АТР в митохондриях, бактериальных клетках и хлоропластах (гл. 23), тем не менее она оставляет пока без ответа многие важные вопросы. Пожалуй, больше всего споров порождает вопрос о механизме, при помощи которого перенос электронов, происходящий во внутренней мембране, вызывает откачивание ионов H^+ из матрикса митохондрии наружу. Митчелл предложил остроумное решение этого вопроса (рис. 1). Основой его решения послужил тот факт, что восстановительные эквиваленты переносятся некоторыми переносчиками (например, убихиноном) в виде атомов Н, а другими (например, железо-серными центрами или цитохромами) – в виде электронов. Митчелл предположил, что водородпереносящие и электронпереносящие белки чередуются в дыхательной цепи, образуя в ней три «петли». В каждой такой петле два атома Н выносятся через мембрану наружу и отдают два иона H^+ в окружающую среду; соответствующая пара электронов переносится затем обратно, с наружной поверхности мембраны на внутреннюю (рис. 1). Каждая пара восстановительных эквивалентов, проходя через такую петлю, переносит два иона H^+ из матрикса в окружающую среду. Предполагается, что каждая петля поставляет осмотическую энергию для образования одной молекулы АТР.

Этот гипотетический механизм представляется достаточно привлекательным, однако он подтверждается не всеми экспериментальными данными. Во-первых, он постулирует определенную последовательность расположения и чередование водород- и электронпереносящих центров, а это не вполне согласуется с имеющимися данными. Во-вторых, при таком механизме на каждую пару электронов в одной петле могут переноситься только два иона H^+, поскольку каждый из выходящих наружу электронов сопровождается только одним протоном. Между тем недавние исследования показали, что на каждую пару электронов в одной петле переносится не менее трех, а возможно, и четыре иона H^+ и что на каждую синтезированную молекулу АТР три или четыре иона H^+ возвращаются в матрикс.

Возникают и другие вопросы. Действительно ли нормальный про-

цесс окислительного фосфорилирования сопровождается выходом ионов H^+ из митохондрий и их возвращением в матрикс? Складывается впечатление, что по крайней мере какая-то часть этого перемещения ионов H^+ может происходить внутри мембраны или же на ее поверхности, а не между двумя водными фазами, разделенными мембраной. Остается без ответа и вопрос о том, каким же именно образом поток ионов H^+ через сложную ATP-синтетазную систему создает новую ковалентную связь, посредством которой присоединяется концевая фосфатная группа ATP.

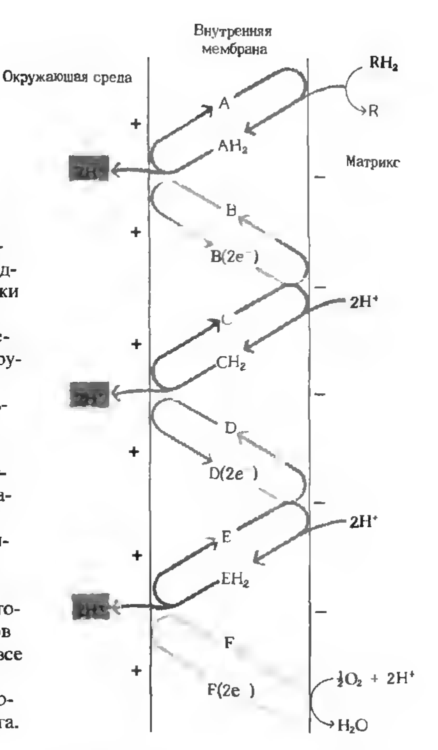


Рис. 1. Механизм переноса ионов H^+, постулируемый хемиосмотической гипотезой. Предполагается, что последовательные переносчики дыхательной цепи (A—F) образуют три H^+-переносящие «петли». Каждая такая петля переносит из митохондриального матрикса наружу два иона H^+ через переносчик (красные стрелки), транспортирующий восстановительные эквиваленты в виде атомов водорода. Два электрона, оставшиеся после выведения в среду двух ионов H^+, возвращаются обратно, т.е. переходят на другую сторону мембраны, с помощью переносчика (серые стрелки), транспортирующего восстановительные эквиваленты в виде электронов. На каждую пару электронов, поступающих от субстрата RH_2 на кислород, эти три петли переносят из митохондриального матрикса в среду шесть ионов водорода ($3 \cdot 2 = 6H^+$). Предполагается, что все компоненты дыхательной цепи фиксированы на мембране. Этим обеспечивается их необходимое расположение друг относительно друга.

Итак, нам предстоит выяснить еще очень многое о молекулярных компонентах и о свойствах энергопреобразующих мембран в митохондриях, бактериальных клетках и хлоропластах. Когда-нибудь, после проведения многих экспериментов и проверки новых идей, мы получим ответы на эти вопросы, но пока их у нас еще нет и виной тому в значительной мере сложная структура внутренней мембраны. Таков путь научного поиска: исследователи строят свои гипотезы, отталкиваясь от экспериментальных наблюдений, а затем проверяют их вновь и вновь, чтобы удостовериться в том, что ни один обнаруженный факт не остался без надлежащего объяснения. В известном смысле можно сказать, что биологическое исследование по-настоящему никогда не кончается. Нередко то, что представлялось нам твердо установленным, оказывается всего лишь неким приближением к истине, только шагом на пути к лучшему пониманию, открывающемуся с появлением новых фактов и новых представлений. Исследование молекулярной логики живых клеток – поистине безграничная область.

17.17. Энергия переноса электронов используется и для других целей

Важнейшая роль переноса электронов – это, конечно, обеспечение энергией синтеза ATP в процессе окислительного фосфорилирования. Однако энергия переноса электронов может использоваться и для других биологических целей (рис. 17-20), например для выработки тепла. У новорожденных детей, у детенышей тех млекопитающих, которые рождаются голыми, и у некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку, имеется в области шеи и в верхней части спины особая жировая ткань, называемая *бурым жиром*. Ее назначение состоит в том, чтобы вырабатывать тепло в процессе окисления жиров. Эта жировая ткань действительно окрашена в бурый цвет, потому что в ней имеется очень много митохондрий, в которых содержится большое количество красновато-бурых пигментов – цитохромов. Специализированные митохондрии бурого жира (рис. 17-21) обычно не синтезируют ATP. Свободная энергия переноса электронов рассеивается ими в виде тепла, благодаря чему и поддерживается на должном уровне температура тела молодых животных. Внутренние мембраны митохондрий бурого жира имеют специальные поры для ионов H^+. Ионы H^+, выведенные из митохондрий в результате переноса электронов, возвращаются в митохондрии через эти поры, минуя F_oF_1-ATPазу. Вследствие этого свободная энергия переноса электронов используется не для синтеза ATP, а для выработки тепла.

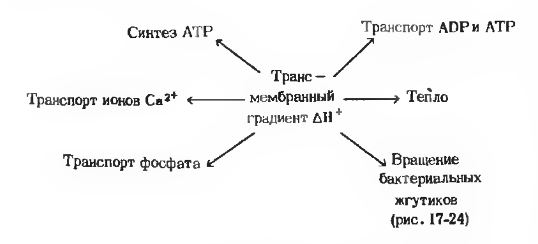


Рис. 17-20. Трансмембранный H^+-градиент поставляет энергию для разных видов клеточной активности.



Рис. 17-21. Поперечный разрез через митохондрию из бурого жира крысы. В этой митохондрии много длинных плотно упакованных крист с высоким содержанием цитохромов, а потому ее дыхательная активность очень велика. Почти вся энергия, генерируемая переносом электронов в митохондриях бурого жира, переходит в тепло, потому что выведенные наружу ионы H^+ возвращаются в матрикс не через ATP-синтетазу, а через открытые поры для H^+-ионов.

Градиент концентрации ионов H^+, возникающий за счет переноса электронов, используется также для переноса ионов Ca^{2+} из цитозоля внутрь митохондрий животной клетки (рис. 17-22). Приток ионов Ca^{2+} в митохондрии уравновешивается оттоком этих ионов, скорость которого регулируется. Таким способом митохондрии помогают поддерживать свойственную клеткам низкую концентрацию Ca^{2+} (около 10^{-7} М). Свободный ион Ca^{2+} – один из важных внутриклеточных посредников, регулирующий многие клеточные функции. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} инициирует или ускоряет такие процессы, как мышечное сокращение (разд. 14.14), распад гликогена (разд. 25.7) и окисление пирувата (разд. 16.10); снижение же концентрации ионов Ca^{2+} замедляет или прекращает их.

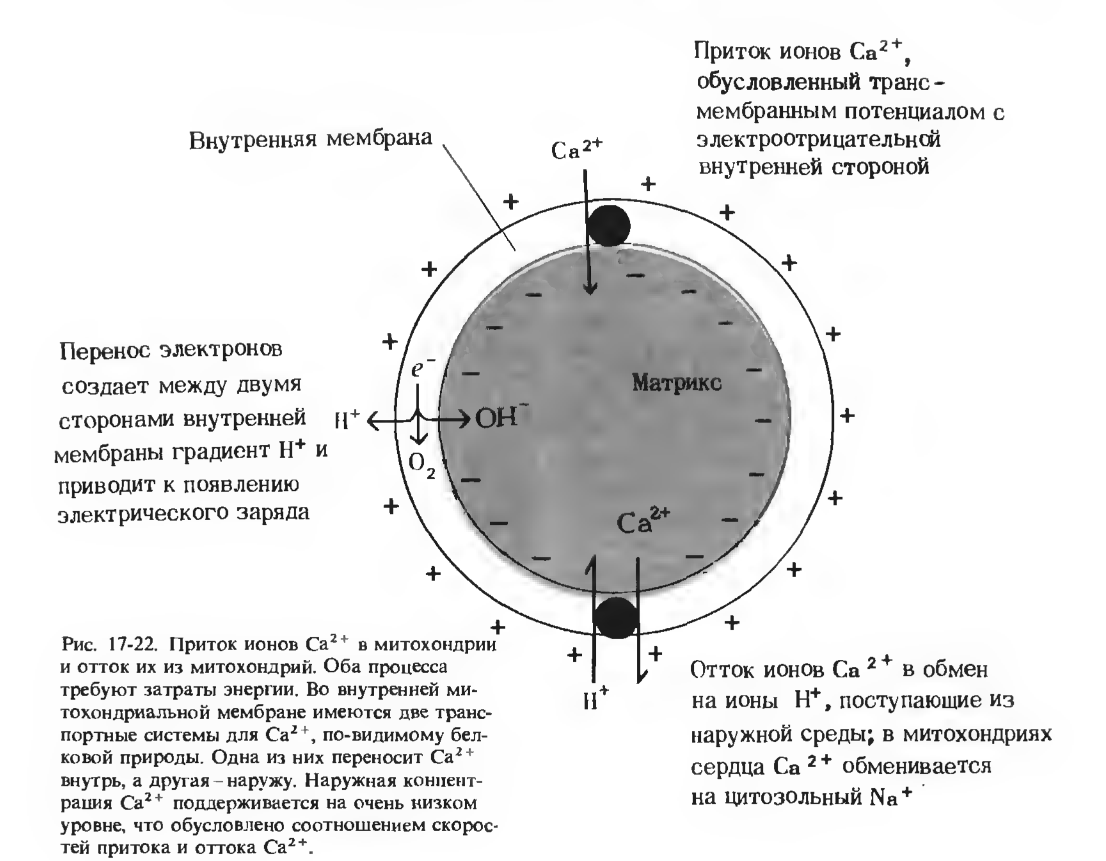


Рис. 17-22. Приток ионов Ca^{2+} в митохондрии и отток их из митохондрий. Оба процесса требуют затраты энергии. Во внутренней митохондриальной мембране имеются две транспортные системы для Ca^{2+}, по-видимому белковой природы. Одна из них переносит Ca^{2+} внутрь, а другая – наружу. Наружная концентрация Ca^{2+} поддерживается на очень низком уровне, что обусловлено соотношением скоростей притока и оттока Ca^{2+}.

17.18. В бактериальных клетках и в хлоропластах также имеются цепи переноса электронов, транспортирующие ионы H^+

Для аэробных бактерий также характерен процесс переноса электронов от NAD-зависимых субстратов на кислород и сопряженное с этим процессом фосфорилирование цитозольного ADP до ATP. Дегидрогеназы находятся в цитозоле бактериальной клетки, а переносчики электронов дыхательной цепи – в ее плазматической мембране, где локализуются также и механизмы сопряжения, генерирующие ATP. При переносе электронов бактериальные клетки тоже выкачивают ионы H^+ наружу. Это сходство в организации цепей переноса электронов (рис. 17-23) у бактерий и митохондрий служит дополнительным доводом в пользу той точки зрения, согласно которой митохондрии происходят от аэробных бактерий, когда-то давно проникших в эукариотические клетки и закрепившихся в них в процессе эволюции (разд. 2.8 и 29.7). Бактериальным жгутикам (разд. 2.5) сообщают вращательное движение «протонные турбины», встроенные в клеточные мембраны бактерий (рис. 17-24).

Хлоропласты фотосинтезирующих растительных клеток, в которых для образования ATP из ADP и фосфата используется улавливаемая ими энергия солнечного света, тоже имеют сложную внутреннюю мембрану, содержащую цепи переноса электронов и ферменты синтеза ATP (подробно об этом см. в гл. 23). Механизмы фосфорилирования в бактериальных клетках и в хлоропластах очень сходны с теми, какие действуют в митохондриях. Это служит еще одним примером молекулярной непрерывности разных видов живых организмов.





Рис. 17-23. Сходство между митохондриями (*А*) и бактериями (*Б*) проявляется в организации цепей переноса электронов, в способности откачивать ионы H^+ и в наличии F_0F_1-АТРазы.

Клеточная мембрана
"Протонная турбина"
Жгутик
Цитозоль
H^+
H^+
H^+
Цепь переноса электронов

Рис. 17-24. Вращение бактериальных жгутиков под действием «протоннодвижущей силы». Бактериальные жгутики – это жесткие структуры, отличающиеся от соответствующих образований эукариотических клеток. Вращательное движение сообщает жгутикам расположенная в клеточной мембране особая структура, которую называют «протонной турбиной». Ионы H^+, выведенные наружу в результате переноса электронов, поступают обратно в клетку через эту «турбину», вызывая вращение жгутика.

17.19. Внутренняя мембрана митохондрий содержит специфические транспортные системы

Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема не только для ионов H^+, OH^- и K^+, но и для многих других ионизованных растворенных веществ. Каким же образом в таком случае попадают в митохондриальный матрикс такие заряженные частицы, как ADP^{3-} и фосфат$^{2-}$, образующиеся в цитозоле при расщеплении АТР, и как новосинтезированный ATP^{4-} (а окислительное фосфорилирование протекает внутри митохондрий) выходит из матрикса наружу?

Во внутренней митохондриальной мембране есть две специфические транспортные системы (рис. 17-25), которые делают это возможным. Первая из них, аденилнуклеотид-транслоказа, переносит ADP^{3-} из цитозоля в митохондрии, причем внутрь поступает по одному ADP^{3-} в обмен на каждый ATP^{4-}, выходящий наружу. Адениннуклеотид-транслоказа – это специфический белок, пронизывающий всю толщу внутренней митохондриальной мембраны и связывающий ADP^{3-} в строго определенном участке наружной поверхности этой мембраны. Перенос ADP^{3-} внутрь митохондрии в обмен на выходящий наружу ATP^{4-} совершается благодаря конформационному изменению молекулы адениннуклеотид-транслоказы. Адениннуклеотид-транслоказная система специфична. Она переносит только АТР и ADP, но не переносит АМР или другие нуклеотиды, например GDP или GTP.

Обнаружен высокоспецифичный ингибитор адениннуклеотид-транслоказы. Таким ингибитором оказался атрактилозид – токсичный гликозид, образуемый

одним видом чертополоха, произрастающим в некоторых районах Средиземноморья. Местным жителям с незапамятных времен известно, что скот может отравиться, если поест этого растения в определенное время года. Выделение этого фактора в чистом виде и выяснение его роли, т.е. того, что он действует как ингибитор переноса адениновых нуклеотидов, явилось результатом ряда блестящих исследований, проведенных итальянскими, французскими, немецкими и американскими биохимиками. Ясно, что если в клетках нарушен транспорт адениновых нуклеотидов и ADP не поступает в митохондрии, а ATP не выходит из них, то регенерация цитозольного ATP и ADP оказывается невозможной.

Вторая транспортная система мембран, участвующая в окислительном фосфорилировании, переносит из цитозоля внутрь митохондрий ион $H_2PO_4^-$, которому сопутствует ион H^+ (рис. 17-25).

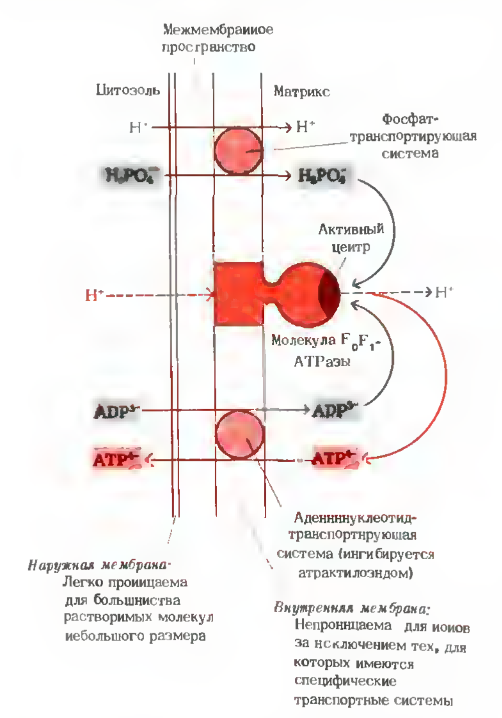


Рис. 17-25. Транспортные системы внутренней митохондриальной мембраны, переносящие ADP и фосфат из цитозоля в матрикс, а новосинтезированный ATP – из матрикса в цитозоль.

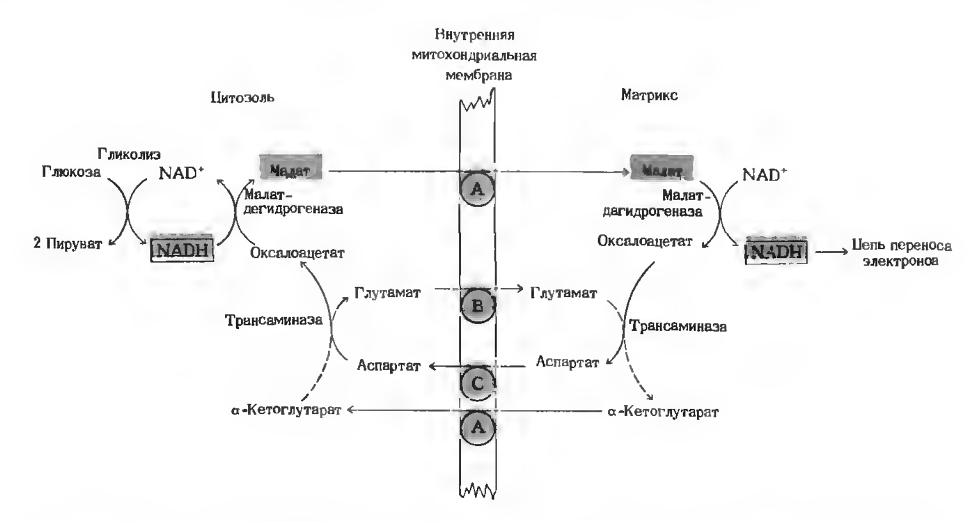
Эта ферментная система, названная *фосфат-транслоказой*, специфична в отношении фосфата; она также ингибируется некоторыми химическими агентами. В результате совместного действия фосфат-транслоказы и адениннуклеотид-транслоказы фосфат и ADP получают возможность проникнуть в митохондриальный матрикс, а ATP – выйти из митохондрий в цитозоль, туда, где протекает большая часть клеточных процессов, требующих затраты энергии.

В митохондриях печени внутренняя мембрана тоже содержит специфичные транспортные системы. Это системы для переноса *пирувата*, поступающего в митохондриальный матрикс из цитозоля, в котором он образуется; для *дикарбоксилатов*, таких, как малат и сукцинат, и, наконец, для *трикарбоксилатов* – цитрата и изоцитрата. В митохондриях есть также транспортные системы, специфичные в отношении аспартата и глутамата.

17.20. В окислении внемитохондриального NADH участвуют челночные системы

NADH-дегидрогеназа внутренней митохондриальной мембраны может присоединять электроны только от NADH, находящегося в матриксе. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для наружного NADH, который находится в цитозоле. Каким же образом может NADH, образующийся в процессе гликолиза, который, как известно, протекает вне митохондрий, вновь окисляться с образованием NAD^+ молекулярным кислородом через дыхательную цепь?

Оказывается, существуют особые *челночные системы*, переносящие восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH в митохондрии непрямым путем. Самая активная из них – это так называемая *малат-аспартатная челночная система*, действующая в митохондриях печени, почек и сердца. Рис. 17-26 поясняет принцип функционирования этой системы. От цитозольного NADH восстановительные эквиваленты сначала переносятся цитозольной малатдегидрогеназой на цитозольный оксалоацетат,



что приводит к образованию малата. Малат, несущий восстановительные эквиваленты, полученные от цитозольного NADH, проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс—его переносит через мембрану система, транспортирующая дикарбоксилаты. Попав внутрь митохондрии, малат отдает эти восстановительные эквиваленты NAD^+ матрикса в реакции, катализируемой матриксной малатдегидрогеназой. NAD^+ восстанавливается при этом в NADH, который может теперь передавать свои электроны прямо в дыхательную цепь внутренней митохондриальной мембраны. На каждую пару электронов, переданных на кислород, синтезируются три молекулы АТР. Другие компоненты этой челночной системы (рис. 17-26) регенерируют цитозольный оксалоацетат; это необходимо для того, чтобы мог начаться новый оборот челночного цикла.

В скелетных мышцах и в мозге перенос восстановительных эквивалентов от NADH осуществляется челночной системой другого типа. Это так называемая *глицеролфосфатная челночная система.* Она отличается от описанной выше малат-аспартатной челночной системы конечным этапом своего действия. Отличие состоит в том, что восстановительные эквиваленты передаются ею в дыхательную цепь не на участке 1, а на участке 2. Окисление NADH дает в этом случае не три молекулы АТР, а только две.

Рис. 17-26. Малат-аспартатная челночная система для переноса восстановительных эквивалентов от цитозольного NADH в митохондриальный матрикс. Несущий восстановительные эквиваленты малат переносится через внутреннюю мембрану при помощи системы, транспортирующей дикарбоксилаты (*A*). Затем эти восстановительные эквиваленты передаются на матриксный NAD^+ малатдегидрогеназой, находящейся в матриксе. Образовавшийся в результате этого уже в матриксе NADH окисляется митохондриальной цепью переноса электронов с одновременным окислительным фосфорилированием. Продукт малатдегидрогеназной реакции, оксалоацетат, не способен пройти через мембрану, чтобы возвратиться в цитозоль. Под действием трансаминазы он превращается в аспартат, который может быть перенесен через мембрану системой *C*, транспортирующей аминокислоты. Назначение других реакций и транспортной системы *B* заключается в том, чтобы регенерировать в цитозоле оксалоацетат. Транспортная система *B* обеспечивает возможность обмена глутамата на аспартат. Система *A* переносит α-кетоглутарат наружу в обмен на малат, поступающий внутрь. Трансаминаза (гл. 19) катализирует обратимый перенос аминогрупп от глутамата на оксалоацетат:

Глутамат + Оксалоацетат $\rightleftharpoons$

$\rightleftharpoons$ α-Кетоглутарат + Аспартат.

17.21. При полном окислении молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТР

Определим теперь выход химической энергии в форме АТР при окислении глюкозы в животных клетках до CO_2 и

H_2O. Гликолитическое расщепление одной молекулы глюкозы в аэробных условиях дает две молекулы пирувата, две молекулы NADH и две молекулы ATP (весь этот процесс протекает в цитозоле):

$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2ADP + 2NAD^+ \rightarrow \rightarrow 2\text{Пируват} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O.$$

Затем две пары электронов от двух молекул цитозольного NADH, образовавшихся в процессе гликолиза под действием глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (разд. 15.7), переносятся в митохондрии при помощи малат-аспартатной челночной системы. Здесь они поступают в цепь переноса электронов и направляются через ряд последовательных переносчиков на кислород. Этот процесс дает $2 \cdot 3 = 6$ATP, поскольку окисление двух молекул NADH описывается следующим уравнением:

$$2NADH + 2H^+ + 6P_i + 6ADP + O_2 \rightarrow 2NAD^+ + 6ATP + 8H_2O.$$

(Конечно, если вместо малат-аспартатной челночной системы действует глицеролфосфатная, то на каждую молекулу NADH образуются не три, а только две молекулы ATP.)

Теперь мы можем написать полное уравнение окисления двух молекул пирувата с образованием двух молекул ацетил-CoA и двух молекул CO_2 в митохондриях. В результате этого окисления образуются две молекулы NADH, которые передают затем два своих электрона через дыхательную цепь на кислород, что сопровождается синтезом трех молекул ATP на каждую пару перенесенных электронов:

$$2\text{Пируват} + 2CoA + 6P_i + 6ADP + O_2 \rightarrow 2\text{Ацетил-CoA} + 2CO_2 + 6ATP + 8H_2O.$$

Напишем также уравнение для окисления двух молекул ацетил-CoA до CO_2 и H_2O через цикл лимонной кислоты и для окислительного фосфорилирования, сопряженного с переносом на кислород электронов, отщепляемых от изоцитрата, α-кетоглутарата и малата: при этом на каждую пару перенесенных электронов образуются по три молекулы ATP. Добавим к этому две молекулы ATP, образующиеся при окислении сукцината, и еще две, которые образуются из сукцинил-CoA через GTP (разд. 16.5, д):

$$2\text{Ацетил-CoA} + 24P_i + 24ADP + 4O_2 \rightarrow 2CoA\text{-}SH + 4CO_2 + 24ATP + 26H_2O.$$

Если теперь просуммировать эти четыре уравнения и сократить общие члены, то мы получим суммарное уравнение для гликолиза и дыхания:

$$\text{Глюкоза} + 38P_i + 38ADP + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 38ATP + 44H_2O.$$

Итак, на каждую молекулу глюкозы, претерпевающую полное окисление до CO_2 и H_2O в печени, почках или миокарде, т.е. там, где функционирует малат-аспартатная челночная система, образуется максимум 38 молекул ATP. (Если вместо малат-аспартатной системы действует глицеролфосфатная, то на каждую полностью окисленную молекулу глюкозы образуется 36 молекул ATP.) Теоретический выход свободной энергии при полном окислении глюкозы равен, таким образом, $38 \cdot 7{,}3 : 686 \cdot 100 = 40\%$ в стандартных условиях (1,0 М). В интактных же клетках эффективность этого превращения, вероятно, превышает 70%, поскольку внутриклеточные концентрации глюкозы, O_2, P_i, ADP и ATP не одинаковы и значительно ниже 1,0 М, т.е. той концентрации, из которой принято исходить при расчетах стандартной свободной энергии (см. дополнение 14-2).

17.22. Образование ATP путем окислительного фосфорилирования регулируется в соответствии с энергетическими нуждами клетки

Рассмотрим теперь, каким образом регулируется синтез ATP, сопряженный

с переносом электронов. Из уравнения, описывающего окисление NADH в митохондриях, видно, что перенос электронов может происходить лишь в том случае, если помимо кислорода имеются также ADP и фосфат:

$$NADH + H^+ + 3P_i + 3ADP + {}^1/_2O_2 \rightarrow NAD^+ + 3ATP + 4H_2O.$$

Во время переноса электронов фосфат и ADP исчезают из цитозоля, а ATP накапливается в нем. В конце концов почти весь ADP в системе в результате окислительного фосфорилирования превращается в ATP. Хотя концентрация неорганического фосфата при этом тоже снижается, тем не менее в клетках она обычно значительно превышает концентрацию ADP. Поэтому после исчерпания запаса ADP в цитозоле скорость потребления кислорода митохондриями неизбежно уменьшается; теперь она составляет лишь небольшой процент от максимальной скорости, поскольку лимитируется низкой концентрацией ADP (рис. 17-27). Эта скорость дыхания соответствует состоянию покоя. Максимального уровня дыхание может достичь лишь после того, как концентрация ADP

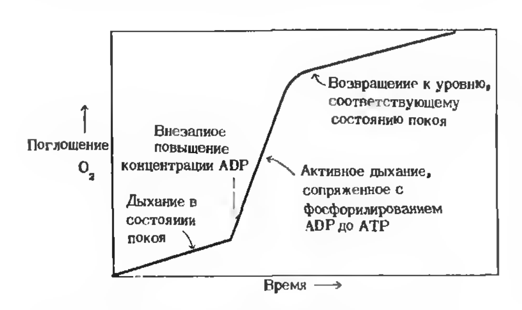


Рис. 17-27. Акцепторный контроль дыхания. При дыхании в состоянии покоя почти весь доступный *ADP* в результате фосфорилирования превращается в ATP, после чего потребление кислорода резко снижается. Если концентрация *ADP* внезапно повысится, например при физической нагрузке, то и скорость потребления кислорода возрастет до уровня, соответствующего активному состоянию. В этот период будет происходить фосфорилирование *ADP* с образованием ATP. Когда почти весь *ADP* перейдет в ATP, скорость дыхания вновь возвратится к уровню, соответствующему состоянию покоя.

в цитозоле повысится. Для того чтобы это произошло, должна увеличиться скорость какого-нибудь клеточного процесса, связанного с затратой энергии. Усиленное потребление энергии ускорит распад ATP до ADP, и наличие ADP сделает возможным фосфорилирование, сопряженное с переносом электронов. Зависимость скорости потребления кислорода от концентрации ADP, играющего роль акцептора фосфата, называют *акцепторным контролем дыхания*. Отношение максимального потребления кислорода в присутствии ADP к его потреблению в состоянии покоя, называемое *коэффициентом акцепторного контроля*, равно в различных тканях животных и человека по меньшей мере 10. У некоторых людей акцепторный контроль дыхания нарушен, что связано, по всей вероятности, с генетическим дефектом. В таких случаях потребление кислорода в тканях все время поддерживается на высоком уровне.

Один из способов характеристики энергетического состояния клеток заключается в том, чтобы выразить его через *отношение действующих масс* ATP-системы (квадратные скобки означают здесь молярные концентрации):

$$\frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}.$$

В норме это отношение очень велико, т.е. система ATP–ADP почти полностью фосфорилирована. В этих условиях концентрация ADP очень низка и не может обеспечить максимальную скорость дыхания. Скорость же синтеза ATP достаточна для удовлетворения текущих нужд клетки. Если, однако, скорость каких-нибудь клеточных процессов, требующих расходования ATP, внезапно возрастет, то часть клеточного ATP расщепится до ADP и фосфата, в результате чего отношение $[ATP]/[ADP][P_i]$ понизится. Повышение концентрации ADP автоматически приведет теперь к повышению скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования, т.е. к усилению регенерации ATP из ADP. Это будет продолжаться до тех пор, пока

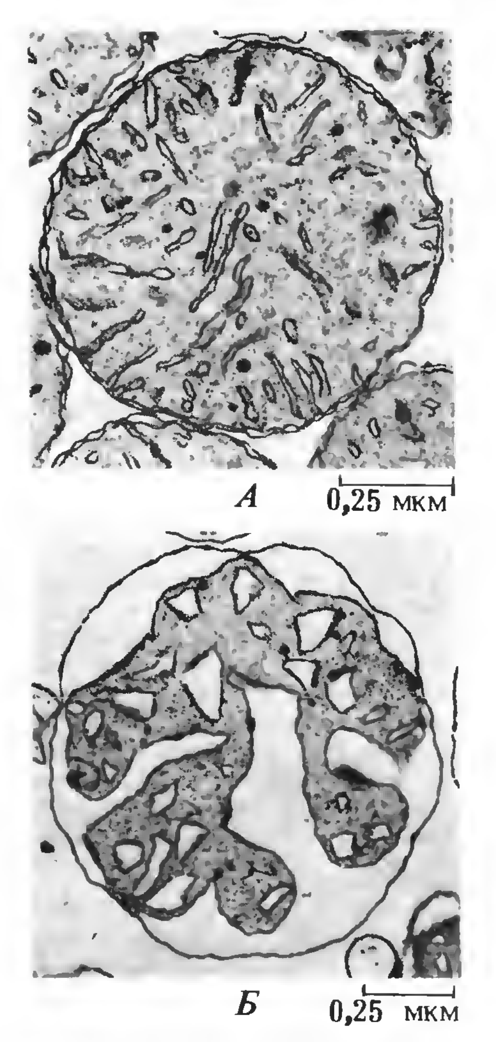


Рис. 17-28. Электронные микрофотографии митохондрий из печени мыши. *А*. Митохондрии в состоянии покоя, когда их энергетический заряд максимален. *Б*. Активно дышащие митохондрии, генерирующие ATP с максимальной скоростью. При переходе из состояния покоя в активное состояние и обратно как внутренняя митохондриальная мембрана, так и матрикс митохондрий претерпевают очень резкие структурные изменения.

отношение [ATP]/[ADP] [P_i] не вернется к своему нормальному высокому уровню; в этот момент дыхание снова замедлится. Скорость окисления клеточного топлива регулируется обычно с такой чувствительностью и точностью, что в большинстве тканей отношение [ATP]/[ADP] [P_i] колеблется в очень узких пределах даже тогда, когда потребность в энергии меняется. ATP образуется со скоростью, как раз достаточной для того, чтобы компенсировать его расход в процессах, требующих затраты энергии.

17.23. Энергетический заряд служит еще одним показателем энергетического состояния клеток

Выше мы видели, что ATP и ADP являются модуляторами важных регуляторных ферментов, участвующих в гликолизе, цикле лимонной кислоты и окислительном фосфорилировании; ATP действует как отрицательный модулятор, а ADP обычно стимулирует катаболизм углеводов. Вследствие этого любое изменение отношения действующих масс [ATP]/[ADP] [P_i], в норме весьма высокого, может соответствующим образом изменять также и активность некоторых регуляторных ферментов центральных катаболических путей. Имеются, однако, среди этих ферментов и такие, для которых положительным модулятором служит AMP. Чтобы оценить участие в метаболической регуляции наряду с ATP и ADP также и AMP, Даниэль Аткинсон ввел понятие *энергетического заряда* и использовал его в качестве одной из характеристик энергетического состояния клеток. Энергетический заряд есть мера «заполнения» всей адениннуклеотидной системы (т. е. суммы ATP, ADP и AMP) высокоэнергетическими фосфатными группами:

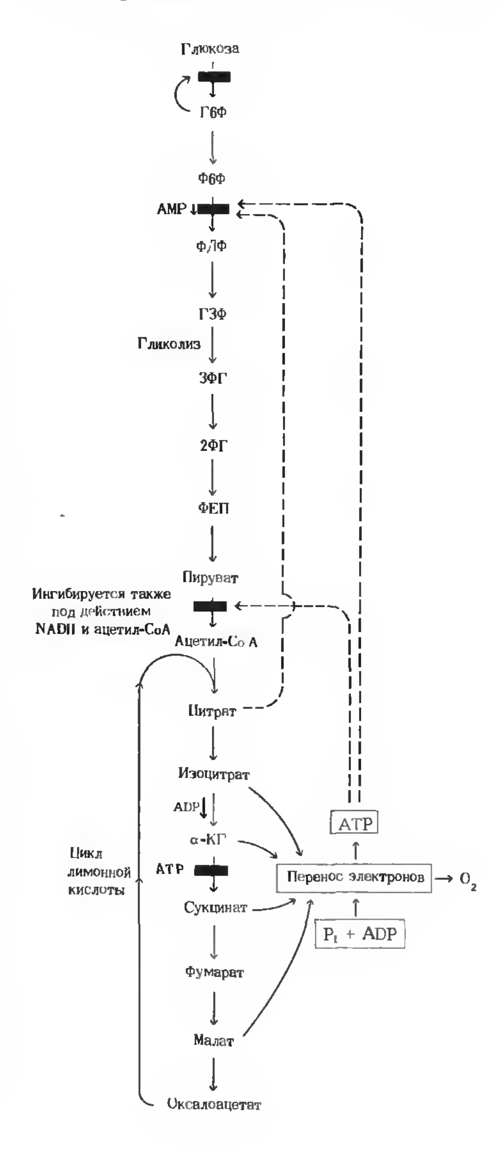
$$\text{Энергетический заряд} = \frac{\text{ATP} + {}^1/_2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}.$$

Если весь адениннуклеотидный пул полностью фосфорилирован, т. е. представлен одним только ATP, то энергетический заряд системы равен 1,0; если же система энергетически «пуста» и весь пул ее адениновых нуклеотидов содержит один только AMP, то ее энергетический заряд равен 0. Обычно энергетический заряд клеток равен приблизительно 0,9,

и это свидетельствует о том, что их аденилатная система почти полностью «заряжена». При некоторых условиях аллостерические взаимодействия между процессами, накапливающими и использующими энергию, легче представить себе, руководствуясь именно понятием энергетического заряда, а не отношением действующих масс АТР-системы. Однако это сложный вопрос, не поддающийся однозначному решению; по-видимому, не существует какого-нибудь одного всеобъемлющего показателя энергетического состояния, с помощью которого можно было бы универсально объяснять регуляцию всех метаболических систем.

17.24. Регуляторные механизмы гликолиза, цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования взаимосвязаны

Три стадии катаболизма углеводов обеспечивают получение энергии: гликолиз (гл. 15), цикл лимонной кислоты (гл. 16) и окислительное фосфорилирование. Каждая из этих стадий регулируется при помощи своих собственных регуляторных механизмов с таким расчетом, чтобы ее скорость была достаточной для удовлетворения сиюминутной потребности клетки в продуктах, образующихся на этой стадии. Более того, эти три стадии так согласованы друг с другом, что все они функционируют в едином экономичном и саморегулируемом режиме, подобно хорошо отлаженной механической системе. Именно так вырабатывается АТР – конечный продукт катаболизма, снабжающего клетку энергией, а также некоторые специфические промежуточные продукты, такие, как пируват и цитрат, используемые в качестве предшественников в процессах биосинтеза других клеточных компонентов. Интеграция этих трех стадий оказывается возможной благодаря взаимосвязи их регуляторных механизмов. На рис. 17-29 видно, что относительные концентрации АТР и ADP (иными словами, отношение действующих масс АТР-системы) определяют не только скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования, но и скорости цикла лимонной кислоты, окисления пирувата и процесса гликолиза. Всякий раз, как увеличивается расходование АТР, т. е. снижается концентрация АТР, а концентрации ADP и P_i возрастают, сразу же вслед за этим возрастают скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования. Одновременно повышается и скорость окисления пирувата через цикл лимонной кислоты, т. е. усиливается приток электронов в дыхательную цепь. Эти



события в свою очередь приводят к увеличению скорости гликолиза, обеспечивая тем самым усиленное образование пирувата. Затем наступает момент, когда отношение [ATP]/[ADP] [P_i] возвращается к своему обычному высокому уровню. Теперь перенос электронов и окислительное фосфорилирование замедляются, поскольку концентрация ADP устанавливается на низком уровне, соответствующем состоянию покоя. Цикл лимонной кислоты и гликолиз при этом также замедляются, потому что ATP действует как аллостерический ингибитор гликолиза и окисления пирувата.

Согласованно действуют также регуляторные ферменты гликолиза и цикла лимонной кислоты. Когда ATP (образующийся в результате окислительного фосфорилирования) и цитрат (первый промежуточный продукт цикла лимонной кислоты) накапливаются в количествах, превышающих их обычный уровень, они, действуя согласованно, вызывают аллостерическое ингибирование фосфофруктокиназы (рис. 17-29), причем эффект от такого двойного ингибирования оказывается большим, чем сумма индивидуальных эффектов. Таким образом, гликолиз контролируется целой сетью взаимосвязанных регуляторных механизмов, благодаря чему пируват образуется лишь с той скоростью, с какой он потребляется в цикле лимонной кислоты, который служит поставщиком электронов для процесса окислительного фосфорилирования.

Рис. 17-29. Взаимозависимая регуляция гликолиза, окисления пирувата, цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования, определяемая относительными концентрациями ATP, ADP и AMP. Регуляторные воздействия, ингибирующие и стимулирующие, обозначены здесь красными полосками и стрелками. При высокой концентрации ATP и соответственно при низких концентрациях ADP и AMP скорости гликолиза, окисления пирувата, цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования минимальны. Если расходование ATP в клетке резко усиливается и, значит, концентрации ADP, AMP и P_i возрастают, то все эти четыре процесса ускоряются. Взаимосвязь гликолиза и цикла лимонной кислоты, осуществляемая через цитрат (она также показана на этой схеме), дополняет регуляторное действие аденилатной системы. Кроме того, при повышении концентраций NADH и ацетил-СоА подавляется процесс окисления пирувата до ацетил-СоА. Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФДФ – фруктозодифосфат; Г3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; 3ФГ – 3-фосфоглицерат; 2ФГ – 2-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпируват; α-КГ – α-кетоглутарат.

В раковых клетках эта координация регуляторных влияний, по-видимому, нарушена: гликолиз протекает в них со значительно большей скоростью, чем это требуется для обеспечения топливом цикла лимонной кислоты. Поэтому аэробные раковые клетки потребляют гораздо больше глюкозы из крови, чем нормальные, но оказываются не в состоянии окислить весь пируват, образовавшийся в процессе гликолиза. Большая его часть окисляется в них до лактата, который уносится кровью.

17.25. В клетках имеются и другие ферменты, использующие в качестве акцептора электронов кислород

Почти во всех клетках около 90% всего потребляемого кислорода восстанавливается с участием цитохромоксидазы митохондрий. Однако в некоторых тканях содержатся ферменты иного типа, катализирующие особые окислительно-восстановительные реакции, в которых атомы кислорода включаются непосредственно в молекулу субстрата с образованием, например, новой гидроксильной или карбоксильной группы. Эти ферменты называются *оксигеназами*. Хотя в таких специализированных реакциях потребляется лишь небольшая часть всего кислорода, поглощаемого клетками, эти реакции очень важны для организма.

Есть два класса оксигеназ: *диоксигеназы* и *монооксигеназы*. *Диоксигеназы* катализируют реакции, в которых в молекулу органического субстрата включаются оба атома молекулы кислорода. Примером такого фермента может служить *пирокатехаза*, катализирующая реакцию окисления *катехола* молекулярным кислородом, сопровождающуюся раскрытием кольца:

$$\text{Катехол} + O{-}O \longrightarrow HOOC{-}CH{=}CH{-}CH{=}CH{-}COOH$$

Катехол

Если в реакции участвует молекулярный кислород, меченный изотопом ^{18}O, то метка (выделена красным) обнаруживается в карбоксильных группах продукта.

Монооксигеназы (их содержание в тканях относительно велико, а их действие отличается большей сложностью) катализируют реакции, в которых в молекулу органического субстрата включается только один из атомов кислорода; второй атом восстанавливается при этом до H_2O. Монооксигеназам требуются два субстрата, которые служат восстановителями двух кислородных атомов O_2. *Главный субстрат* присоединяет один из двух атомов кислорода, а *косубстрат* поставляет атомы H для восстановления второго атома кислорода до H_2O. Общее уравнение для реакций, катализируемых монооксигеназами, имеет вид

$$AH + BH_2 + O{-}O \rightarrow$$

$$\rightarrow A{-}OH + B + H_2O,$$

где AH – главный субстрат, присоединяющий один атом кислорода, а BH_2 – косубстрат, поставляющий атомы H для восстановления второго атома кислорода до H_2O. Поскольку в реакциях, катализируемых монооксигеназами, главный субстрат по большей части гидроксилируется, эту группу ферментов называют также *гидроксилазами*. Иногда их называют еще *оксигеназами со смешанной функцией*, поскольку они окисляют одновременно два разных субстрата.

Монооксигеназы подразделяются на несколько классов в зависимости от природы участвующего в реакции косубстрата, который поставляет два атома H для образования H_2O. Одни монооксигеназы используют для этой цели в качестве косубстратов восстановленные флавиновые нуклеотиды ($FMNH_2$ или $FADH_2$), другие – NADH или NADPH, а третьи – α-кетоглутарат. Одним из важных примеров среди монооксигеназ может служить фермент, катализирующий гидроксилирование ароматического кольца фенилаланина, в результате чего образуется тирозин (гл. 19). Врожденное нарушение активности этого фермента лежит в основе генетической болезни, носящей название *фенилкетонурии*.

Наиболее многочисленны и особенно сложны монооксигеназные реакции, в которых участвует *цитохром P-450*, принадлежащий к группе гемопротеинов. Этот цитохром обычно содержится не в митохондриях, а в эндоплазматическом ретикулуме. Подобно митохондриальной цитохромоксидазе, цитохром P-450 способен взаимодействовать и с кислородом, и с окисью углерода. Отличается же он от цитохромоксидазы тем, что комплекс его восстановленной формы с окисью углерода сильно поглощает свет в области 450 нм.

Цитохром P-450 катализирует реакции гидроксилирования, в которых органический субстрат RH гидроксилируется до R–OH за счет одного из атомов кислорода O_2, тогда как второй атом кислорода восстанавливается до H_2O в результате присоединения восстановительных эквивалентов от NADH или NADPH, но чаще от одного из белков, содержащих железо и серу. На рис. 17-30 такая реакция представлена в упрощенном виде; в действительности же она включает ряд промежуточных этапов, пока еще недостаточно изученных. Цитохром P-450 участвует, например, в гидроксилировании стероидов в процессе образования гормонов коры надпочечников. Существенна также роль цитохрома P-450 в гидроксилировании ряда лекарственных препаратов и других чужеродных для организма веществ, особенно если эти вещества сравнительно плохо растворимы в воде. В результате гидроксилирования растворимость таких чужеродных веществ в воде повышается, что в сильной мере способствует их детоксикации и выведению из организма (гл. 24). Цитохром P-450 суще-

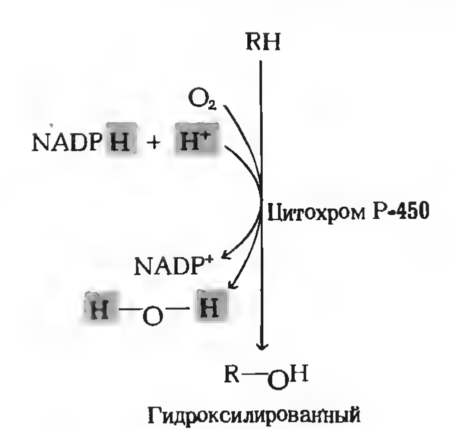


Рис. 17-30. Гидроксилирование растворимого в липидах лекарственного препарата RH под действием цитохрома Р-450, функционирующего как монооксидаза. У продукта реакции, R—OH, выше растворимость в воде, и поэтому он легче выводится из организма. Косубстратом, поставляющим атомы H (серый фон) для восстановления второго атома кислорода до воды, служит NADPH + H^+.

ствует в различных формах, специфичных в отношении тех или иных субстратов.

Краткое содержание главы

В реакциях, связанных с переносом электронов, т.е. в реакциях окисления-восстановления, способность донора электронов (восстановителя) отдавать электроны характеризуется стандартным восстановительным потенциалом E_0'. Окислительно-восстановительные системы, обладающие более электроотрицательными значениями E_0', стремятся передать свои электроны системам с более электроположительными значениями E_0'. Изменение стандартной свободной энергии в окислительно-восстановительных реакциях определяется из уравнения $\Delta G^{0'} = -nF\Delta E_0'$. В митохондриях атомы водорода, отщепленные от субстратов дегидрогеназами, передают свои электроны в цепь переноса электронов. Переходя по этой цепи от одного переносчика к другому, электроны в конечном итоге достигают молекулярного кислорода и восстанавливают его в H_2O. Энергия, высвобождающаяся в процессе переноса электронов, используется для окислительного фосфорилирования ADP в АТР. Окислительное фосфорилирование протекает во внутренней митохондриальной мембране.

От всех NAD-зависимых реакций дегидрирования восстановительные эквиваленты переходят к митохондриальной NADH-дегидрогеназе, содержащей в качестве простетической группы FMN. Затем через ряд железо-серных центров они передаются на убихинон, который передает электроны цитохрому *b*. Далее электроны переходят последовательно на цитохромы c_1 и c, а затем на цитохром aa_3 (цитохромоксидазу), которая содержит медь. Цитохромоксидаза передает электроны на O_2. Для того чтобы полностью восстановить O_2 с образованием двух молекул H_2O, требуются четыре электрона и четыре иона H^+. Перенос электронов блокируется в определенных точках ротеноном, антимицином А и цианидом. Процесс переноса электронов сопровождается значительным снижением свободной энергии. В трех участках дыхательной цепи происходит запасание энергии в результате синтеза АТР из ADP и P_i. Окислительное фосфорилирование и перенос электронов можно разобщить, воспользовавшись для этого разобщающими агентами или ионофорами, такими, как валиномицин. Для того чтобы могло происходить окислительное фосфорилирование, внутренняя митохондриальная мембрана должна сохранять свою целостность и должна быть непроницаемой для ионов H^+ и некоторых других ионов. Перенос электронов сопровождается «выталкиванием» ионов H^+ из митохондрий. Согласно хемиосмотической гипотезе (одной из трех гипотез, предложенных для объяснения механизма окислительного фосфорилирования), перенос электронов создает между двумя сторонами внутренней митохондриальной мембраны градиент концентрации ионов H^+, при котором их концентрация снаружи выше, чем внутри. Предполагается, что именно этот градиент служит движущей силой синтеза АТР, когда ионы H^+, возвращающиеся из цитозоля в матрикс, проходят через

молекулы F_oF_1-ATPазы в мембране. Во внутренней митохондриальной мембране имеются транспортные системы для адениновых нуклеотидов, фосфата и ряда метаболитов. Перенос электронов тормозится при понижении концентрации ADP и ускоряется, когда концентрация ADP возрастает благодаря тем или иным клеточным процессам, сопровождающимся утилизацией ATP. Скорости гликолиза, цикла лимонной кислоты и процесса окислительного фосфорилирования согласованы между собой. Эта согласованность обеспечивается взаимосвязанными регуляторными механизмами, которые реагируют на величину отношения $[ATP]/[ADP][P_i]$ и на содержание некоторых наиболее важных метаболитов, отражающих энергетическое состояние клеток.

В клетках протекают также окислительные реакции, в процессе которых атомы кислорода включатся в органические молекулы, прежде всего в относительно гидрофобные молекулы различных чужеродных веществ и лекарственных препаратов с образованием гидроксилированных и карбоксилированных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

Общие сводки

Dickerson R. E. Cytochrome c and the Evolution of Energy Metabolism, Sci. Am., **242**, 137–153, March (1980).

Hinkle P., McCarty R. E. How Cells Make ATP. Sci. Am., **238**, 104–123, March (1978).

Whittaker D. A., Danks S. M. Mitochondria: Structure, Function and Assembly, Longman, London, 1978. Краткий, написанный на современном уровне обзор. Материал ясно изложен и хорошо иллюстрирован. Прекрасное руководство для общего ознакомления с вопросом.

История вопроса и общие сведения

Keilin D. The History of Cell Respiration and Cytochromes, Cambridge University Press, London, 1966.

Lehninger A. L. The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function, Benjamin, New York, 1965. (Имеется перевод: Ленинджер А. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции.– М.: Мир, 1966.) Митохондрии как силовые станции клетки.

Racker E. A New Look at Mechanisms in Bioenergetics, Academic, New York, 1976. (Имеется перевод: Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды.– М.: Мир, 1979.) Отчет о собственных исследованиях с забавными комментариями.

Механизм окислительного фосфорилирования

Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E. C. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, Ann. Rev. Biochem., **46**, 955–1026 (1977). Различные представления о механизме окислительного фосфорилирования в изложении ведущих исследователей, работающих в этой области.

Mitchell P. Kellin's Respiratory Chain Concept and Its Chemiosmotic Consequences, Science, **206**, 1148–1159 (1979). Речь при вручении Нобелевской премии, в которой вкратце рассказано о том, как создавалась хемиосмотическая гипотеза.

Tedeschi H. Mitochondria: Structure, Biogenesis, and Transducing Functions, Springer-Verlag, New York, 1976. Более подробная сводка.

Специальные темы

Lehninger A. L. Mitochondria and Biological Mineralization Processes: an Exploration. In: E. Quagliariello, F. Palmieri and T. Singer (eds), Horizons in Biochemistry and Biophysics, vol. 4, pp. 1–30, Addison-Wisley, Reading, Mass., 1977. Поскольку митохондрии наряду с фосфатом накапливают и Ca^{2+}, они, возможно, служат тем местом, где протекают первые стадии процесса биологического кальцинирования.

Luft R., Irkos D., Palmieri G., Ernster L., Afzelius B. A Case of Severe Hypermetabolism of Non-Thyroid Origin with a Defect in Mitochondrial Respiratory Control: A Correlated Clinical, Biochemical, and Morphological Study, J. Clin. Invest., **41**, 1776–1804 (1962). Первый изученный случай нарушения регуляции переноса электронов у человека.

Вопросы и задачи

1. *Окислительно-восстановительные реакции.* NADH-дегидрогеназный комплекс митохондриальной цепи переноса электронов катализирует следующие окислительно-восстановительные реакции (Fe^{3+} и Fe^{2+} означают здесь атомы железа железо-

серных центров, Q – убихинон, QH_2 – убихинол и E – фермент):

1) $NADH + H^+ + E{-}FMN \rightarrow NAD^+ + E{-}FMNH_2$

2) $E{-}FMNH_2 + 2Fe^{3+} \rightarrow E{-}FMN + 2Fe^{2+} + 2H^+$

3) $2Fe^{2+} + 2H^+ + Q \rightarrow 2Fe^{3+} + QH_2$

Суммарная реакция: $NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2$

Укажите для каждой из этих трех реакций, катализируемых NADH-дегидрогеназным комплексом: а) донор электронов, б) акцептор электронов, в) сопряженную окислительно-восстановительную пару, г) восстановитель и д) окислитель.

2. *Стандартные восстановительные потенциалы.* Стандартный восстановительный потенциал любой окислительно-восстановительной пары определяется реакцией, протекающей в полуэлементе:

Окислитель + (*n*)Электроны = Восстановитель.

Стандартные восстановительные потенциалы двух сопряженных пар NAD^+/NADH и пируват/лактат равны соответственно −0,32 и −0,19 В.

а) Какая из этих пар обладает большей способностью отдавать электроны? Аргументируйте свой ответ.

б) Какая из них является более сильным окислителем? Почему?

в) В каком направлении пойдет реакция

$$\text{Пируват} + NADH + H^+ = \text{Лактат} + NAD^+,$$

если в начальный момент времени концентрации исходных веществ и продуктов равны 1 М при pH7?

г) Чему равно изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ для этой реакции при 25°С?

д) Чему равна константа равновесия этой реакции при 25°С?

3. *Последовательность расположения переносчиков в цепи переноса электронов у одного из растений.* Изучение цепи переноса электронов в клетках листьев шпината выявило в этих клетках ряд веществ, способных обратимо присоединять электроны. Ниже приведены стандартные восстановительные потенциалы этих веществ.

Восстановленная форма	Окисленная форма	E_0', В
Цитохром b_6 (Fe^{2+})	Цитохром b_6 (Fe^{3+})	−0,06
Цитохром *f* (Fe^{2+})	Цитохром *f* (Fe^{3+})	+0,365
Ферредоксин (восстановленный)	Ферредоксин (окисленный)	−0,432
Ферредоксин-восстанавливающий субстрат (восстановленный)	Ферредоксин-восстанавливающий субстрат (окисленный)	−0,60
Пластоцианин (восстановленный)	Пластоцианин (окисленный)	+0,40

Укажите вероятную последовательность этих переносчиков электронов в дыхательной цепи, исходя из величин их стандартных восстановительных потенциалов. Составьте энергетическую диаграмму, подобную той, которая изображена на рис. 17-4. На каких этапах переноса выделение свободной энергии (в стандартных условиях) представляется недостаточным для того, чтобы на каждую пару переносимых электронов могла синтезироваться одна молекула ATP?

4. *Баланс синтеза ATP, сопряженного с окислением субстрата.* Ниже указаны четыре субстрата. Рассчитайте число молекул ATP, образующихся при полном окислительном расщеплении одной молекулы каждого из этих субстратов до CO_2 и H_2O.

а) Фруктозо-6-фосфат

б) Ацетил-СоА

в) Глицеральдегид-3-фосфат

г) Сахароза

5. *Энергетический диапазон дыхательной цепи.* Перенос электронов в митохондриальной дыхательной цепи описывается следующим суммарным уравнением:

$$NADH + H^+ + {}^1/_2O_2 = H_2O + NAD^+.$$

а) Вычислите величину $\Delta E_0'$ для этой суммарной реакции митохондриального переноса электронов.

б) Вычислите изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ для этой реакции.

в) Сколько молекул ATP теоретически может быть синтезировано за счет этой реакции, если изменение стандартной свободной энергии образования ATP равно +7,3 ккал/моль?

6. *При окислении сукцината акцептором электронов служит не NAD^+, а FAD.* На всех этапах, связанных с дегидрированием, в процессе гликолиза и в цикле лимонной кислоты акцептором электронов служит NAD^+ ($E_0' = -0{,}32$ В). Единственным исключением является реакция, катализируемая сукцинатдегидрогеназой, использующей в качестве акцептора электронов ковалентно связанный с ней FAD ($E_0' = +$ $+0{,}05$ В). Почему FAD является более подходящим акцептором электронов, чем NAD^+, при дегидрировании сукцината? Предложите возможное объяснение этого факта, исходя из сравнения величин E_0' сукцинат-фумаратной системы, сопряженной пары NAD^+/NADH и пары FAD/$FADH_2$.
7. *Степень восстановления переносчиков электронов в дыхательной цепи.* Степень восстановления каждого из переносчиков электронов в дыхательной цепи определяется условиями, существующими в митохондриях. Когда NADH и молекулярного кислорода достаточно, соответствующая стационарному состоянию степень восстановления переносчиков снижается при переходе электронов от субстрата на кислород. Если перенос электронов блокирован, то переносчики, занимающие в дыхательной цепи место перед блокированным этапом, становятся более восстановленными, а те, которые располагаются после блока,– более окисленными, как это поясняет гидравлическая модель дыхательной цепи, изображенная на рис. 17-14. Как будут выглядеть такие модели для следующих четырех случаев:
   а) Достаточно NADH и O_2, но добавлен цианид.
   б) Достаточно NADH, но исчерпан запас O_2.
   в) Достаточно O_2, но исчерпан запас NADH.
   г) Достаточно и NADH, и O_2.
8. *Влияние ротенона и антимицина А на перенос электронов.* Ротенон (токсичное вещество, вырабатываемое одним из видов растений) резко подавляет активность митохондриальной NADH-дегидрогеназы. Токсичный антибиотик антимицин А сильно ингибирует окисление убихинола.
   а) Почему ротенон оказывается смертельным ядом для некоторых насекомых и рыб?
   б) Почему антимицин А действует как яд в животных тканях?
   в) Допустим, что оба эти вещества блокируют соответствующие участки дыхательной цепи с равной эффективностью. Какое из них будет при этом более мощным ядом? Дайте аргументированный ответ.
9. *Разобщающие агенты при окислительном фосфорилировании.* В нормальных митохондриях скорость переноса электронов строго согласована с потребностью в ATP. Поэтому если скорость использования ATP сравнительно невелика, то соответственно небольшой оказывается и скорость переноса электронов. Если же ATP расходуется с большой скоростью, то скорость переноса электронов тоже бывает высокой. В подобных условиях (при тесном сопряжении этих двух процессов) отношение P/O, т.е. число образовавшихся молекул ATP, в расчете на один атом потребленного кислорода, когда донором электронов служит NADH, равно приблизительно 3.
   а) Как должна влиять относительно низкая и относительно высокая концентрация разобщающего агента на скорость переноса электронов и на величину P/O?
   б) Прием внутрь разобщающих агентов вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. Дайте этому феномену объяснение на молекулярном уровне. Как изменяется отношение P/O в присутствии разобщающих агентов?
   в) 2,4-динитрофенол, который является разобщающим агентом, пытались одно время использовать для борьбы с ожирением. На чем в принципе может быть основано подобное его действие? Теперь такого рода разобщающие агенты уже не применяются в качестве лекарственных препаратов, поскольку известны случаи, когда их применение приводило к летальному исходу. Почему прием разобщающих агентов может вызвать смерть?
10. *Механизм действия дициклогексилкарбодиимида* (ДЦКД, или DCCD). Если к суспензии активно дышащих митохондрий, в которых дыхание тесно сопряжено с фосфорилированием, добавить DCCD, то наблюдается резкое уменьшение скорости переноса электронов (оцениваемой по количеству поглощенного кислорода) и скорости фосфорилирования (оцениваемой по образованию ATP). Добавив затем к таким ингибированным митохондриальным препаратам 2,4-динитрофенол, мы обнаружим, что потребление кислорода возвращается к нормальному уровню, однако синтез ATP так и остается подавленным.

а) На какой этап процесса переноса электронов или окислительного фосфорилирования влияет DCCD?

б) Почему DCCD нарушает потребление O_2 в митохондриях? Каков механизм действия 2,4-динитрофенола на препарат ингибированных митохондрий?

в) С каким из перечисленных ниже ингибиторов более всего сходен по своему действию DCCD: с антимицином А, ротеноном, олигомицином или арсенатом?

11. *Окислительное фосфорилирование в инвертированных субмитохондриальных пузырьках.* Согласно хемиосмотической гипотезе, во время переноса электронов из интактных митохондрий «откачиваются» наружу ионы H^+, что приводит к возникновению градиента pH между двумя сторонами митохондриальной мембраны. Этот градиент pH заключает в себе энергию, благодаря которой ионы H^+ перемещаются в обратном направлении – из окружающей среды в митохондриальный матрикс. При этом ионы H^+ проходят через молекулы F_0F_1-АТРазы, чем обеспечивается синтез АТР из ADP и P_i. Удалось показать, что полученные из внутренней митохондриальной мембраны инвертированные пузырьки, у которых F_0F_1-АТРазные головки обращены наружу (рис. 17-15), тоже способны к окислительному фосфорилированию.

а) Нарисуйте схему, которая показывала бы направление откачивания ионов H^+ во время переноса электронов в субмитохондриальных пузырьках.

б) Укажите на этой схеме направление потока ионов H^+ через молекулы F_0F_1-АТРазы во время синтеза АТР.

в) Как будут влиять на перенос электронов и на синтез АТР в таких субмитохондриальных пузырьках олигомицин и атрактилозид?

12. *Митохондрии бурого жира.* У новорожденных детей в области шеи и в верхней части спины имеется особая жировая ткань, которая у взрослых практически отсутствует,– так называемый бурый жир. Бурую окраску придают этой ткани митохондрии, которых в ней чрезвычайно много. У некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку или приспособленных к обитанию в холодных местностях, тоже имеется бурый жир. В то время как в митохондриях печени при окислении NADH на каждый атом поглощенного кислорода образуются обычно три молекулы АТР, в митохондриях бурого жира выход АТР на один атом поглощенного кислорода составляет менее одной молекулы.

а) Какая физиологическая функция может определяться этим низким отношением Р/О в буром жире новорожденных?

б) Укажите возможные механизмы, которые могли бы определять столь низкое отношение Р/О, характерное для митохондрий бурого жира.

13. *Дикарбоксилатная транспортная система митохондрий.* Во внутренней митохондриальной мембране имеется дикарбоксилатная транспортная система, которая обеспечивает перенос через мембрану малата и α-кетоглутарата. Эта транспортная система ингибируется *н*-бутилмалонатом. Предположим, что *н*-бутилмалонат добавлен к суспензии аэробных почечных клеток, использующих в качестве топлива одну только глюкозу. Как должен подействовать *н*-бутилмалонат на а) гликолиз, б) потребление кислорода, в) образование лактата и г) синтез АТР?

14. *Эффект Пастера.* Если в суспензию анаэробных клеток, потребляющих глюкозу с большой скоростью, ввести кислород, то клетки начнут его поглощать и уровень потребления глюкозы резко понизится. Одновременно с этим прекратится накопление лактата. Этот эффект, характерный для клеток, способных и к аэробному, и к анаэробному потреблению глюкозы, впервые наблюдал Луи Пастер в 60-х годах прошлого века, и потому он был назван эффектом Пастера.

а) Почему при введении в клеточную суспензию кислорода прекращается накопление лактата?

б) Почему в присутствии кислорода снижается скорость потребления глюкозы?

в) Каким образом после начавшегося потребления кислорода понижается скорость потребления глюкозы? Объясните это, исходя из специфичного действия ферментов.

15. *Изменение энергетического заряда клеток.* При изменении физиологической активности клеток скелетных мышц энергетический заряд этих клеток, равный в норме 0,89, сначала резко снижается приблизительно до 0,70, а потом постепенно возвращается к своему обычному уровню.

а) Какое именно изменение активности обусловливает это внезапное уменьшение энергетического заряда? Поясните свой ответ.

б) Как должно повлиять это внезапное из-

менение на скорость гликолиза и дыхания?

в) Каким образом энергетический заряд способен влиять на гликолиз и дыхание?

16. *Сколько ионов H^+ содержится в одной митохондрии?* Хемиосмотическая гипотеза предполагает, что в результате переноса электронов ионы H^+ «выталкиваются» из матрикса митохондрий наружу, вследствие чего между двумя сторонами митохондриальной мембраны возникает градиент pH, при котором наружная фаза оказывается более кислой, чем внутренняя. Способность ионов H^+ диффундировать в обратном направлении, из окружающей среды в митохондриальный матрикс (где их концентрация ниже), служит, согласно этой гипотезе, движущей силой для синтеза ATP, катализируемого F_0F_1-АТРазой. В митохондриях, суспендированных в среде с pH 7,4, происходит окислительное фосфорилирование. Найдено, что pH митохондриального матрикса равен при этом 7,7.

а) Вычислите, чему равны молярные концентрации ионов H^+ в окружающей среде и в матриксе митохондрий для этих условий.

б) Определите отношение концентраций H^+ снаружи и внутри, дающее представление об энергии, которую эта разность концентраций в себе заключает (см. гл. 14).

в) Определите число ионов H^+, приходящееся на одну дышащую митохондрию печени. При этом расчете исходите из предположения, что внутреннее пространство митохондрии представляет собой сферу диаметром 1,5 мкм.

г) Учитывая полученные вами данные, можно ли считать один только этот градиент pH достаточным источником энергии для синтеза ATP?

д) Если, по вашему мнению, одного этого градиента pH недостаточно, то какой другой источник энергии, необходимой для синтеза ATP, могли бы вы указать?

ГЛАВА 18

ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

Триацилглицеролы – очень важный источник энергии в организме животных. Среди главных питательных веществ они самые калорийные (свыше 9 ккал/г); в клетках триацилглицеролы откладываются в запас в виде жировых капелек, состоящих из почти чистого жира, и могут в очень больших количествах накапливаться и сохраняться в жировой ткани. В высокоразвитых странах в среднем не менее 40% суточной потребности человека в энергии покрывается именно за счет содержащихся в его рационе жиров. В некоторых органах, в частности в печени, сердце и в скелетных мышцах, находящихся в состоянии покоя, свыше половины необходимой энергии поставляют триацилглицеролы. У животных, впадающих в спячку, и у перелетных птиц триацилглицеролы служат практически единственным источником энергии. Дальше (гл. 21) мы узнаем, что и углеводы, если только их накапливается слишком много (а способность организма хранить гликоген крайне ограничена), тоже превращаются в триацилглицеролы для длительного хранения.

Около 95% всей биологически доступной энергии в молекуле триацилглицеролов заключают в себе остатки трех жирных кислот с длинной цепью и только 5% приходится на долю остатка глицерола. В этой главе мы займемся рассмотрением тех метаболических путей, по которым в животном организме идет окисление этих высокоэнергетических жирных кислот до CO_2 и воды, сопровождающееся выделением энергии. Мы увидим, что у жирных кислот и углеводов конечный путь окисления одинаков: этим общим конечным путем служит цикл лимонной кислоты.

18.1. Жирные кислоты активируются и окисляются в митохондриях

Поскольку почти все жирные кислоты в животных тканях имеют четное число атомов углерода, уже давно предполагалось, что в клетке жирные кислоты синтезируются и разрушаются путем присоединения или отщепления двухуглеродных фрагментов. Классические эксперименты Франца Кноопа, проведенные им в Германии в начале нашего века, подтвердили это предположение и позволили Кноопу заключить, что окисление жирных кислот происходит путем последовательного отщепления двухуглеродных фрагментов по β-*схеме*, т.е. каждый раз окисляется β-углеродный атом, в результате чего образуется β-кетокислота, которая затем подвергается расщеплению с образованием двухуглеродного фрагмента (по-видимому, уксусной кислоты) и жирной кислоты, содержащей на два атома углерода меньше, чем исходная кислота (рис. 18-1).

Однако в течение нескольких десятилетий попытки продемонстрировать окисление жирных кислот в бесклеточных экстрактах или в гомогенатах животных тканей оставались безрезультатными. Важный шаг в этой области был сделан, когда Альберт Ленинджер в США обна-

Соединения, скармливаемые животным

Продукты, выделенные из мочи

$C_6H_5—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—COOH \longrightarrow C_6H_5—CH_2—COOH$

Цепь с четным числом атомов углерода

Фенилуксусная кислота

$C_6H_5—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—COOH \longrightarrow C_6H_5—COOH$

Цепь с нечетным числом атомов углерода

Бензойная кислота

Рис. 18-1. Окисление фенилзамещенных жирных кислот (опыты Кноопа). Кнооп скармливал кроликам жирные кислоты, меченные фенильной группой при ω-углеродном атоме, т.е. при атоме углерода концевой метильной группы. При скармливании ω-фенилзамещенных жирных кислот с четным числом атомов углерода в моче животных всегда обнаруживалась в качестве конечного продукта окисления фенилуксусная кислота, а при скармливании кислот с нечетным числом атомов углерода – бензойная кислота. Из этого наблюдения Кнооп заключил, что окисление цепи жирной кислоты начинается с β-углеродного атома и протекает путем последовательного отщепления от цепи двухуглеродных фрагментов (как это показано на рисунке поперечными пунктирными линиями красного цвета). Двухуглеродные фрагменты отщепляются, вероятно, в виде ацетата, который затем окисляется до CO_2 и H_2O. Остальная часть молекулы жирной кислоты (показана на красном фоне) уже более не окисляется и выводится из организма.

ружил, что добавление ATP к гомогенатам печени восстанавливает их способность к окислению жирных кислот. Ленинджер предположил, что ATP требуется для активации карбоксильной группы жирной кислоты в какой-то ферментативной реакции. Он также установил, что окисление жирных кислот в гомогенатах печени приводит к образованию активных двухуглеродных фрагментов, способных включаться в цикл лимонной кислоты. Позже Ленинджер показал, что окисление жирных кислот протекает в митохондриях клеток печени. Следующим важным шагом, способствовавшим быстрому выяснению отдельных ферментативных этапов процесса окисления жирных кислот, явились исследования Феодора Линена и его сотрудников в Мюнхене. Они нашли, что ATP-зависимая активация жирных кислот включает ферментативную этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты тиоловой группой кофермента А и что все последующие промежуточные продукты процесса окисления жирных кислот представляют собой тиоэфиры кофермента А. Проследим путь окисления жирных кислот в свете современных знаний.

18.2. Процесс поступления жирных кислот в митохондрии состоит из трех этапов

Жирные кислоты поступают в цитозоль из двух источников. Некоторые свободные жирные кислоты доставляются клеткам кровью, будучи присоединены к сывороточному альбумину. Отделившись от него, они проходят сквозь клеточные мембраны в цитозоль. Вторым источником жирных кислот служат содержащиеся в самом цитозоле триацилглицеролы, расщепляющиеся под действием липаз. Свободные жирные кислоты, присутствующие в цитозоле, не способны пройти через митохондриальные мембраны. Они могут попасть в митохондриальный матрикс, в котором происходит их окисление, лишь после того, как подвергнутся ряду ферментативных превращений в трехэтапном процессе. Первый этап этих превращений осуществляется *ацил-CoA-синтетазами* – ферментами, присутствующими в наружной митохондриальной мембране. Эти ферменты катализируют реакцию

$$\mathrm{RCOOH + ATP + CoA\text{-}SH \rightleftharpoons \underset{\text{Ацил-CoA}}{R{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}S{-}CoA} + AMP + PP_i} \qquad (1)$$

где RCOOH означает жирную кислоту с длинной цепью, а PP_i – неорганический пирофосфат. В ходе этой реакции возникает *тиоэфирная* связь между карбоксильной группой жирной кислоты и тиоловой группой кофермента А, т.е. образуется СоА-производное жирной кислоты (рис. 18-2); одновременно АТР расщепляется на АМР и неорганический пирофосфат. Это *сопряженная реакция*: энергия, высвобождающаяся при расщеплении АТР на АМР и пирофосфат, используется в активном центре фермента для образования новой тиоэфирной связи. СоА-производные жирных кислот, так же как и ацетил-СоА, представляют собой высокоэнергетические соединения: их гидролиз до свободной жирной кислоты и СоА—SH характеризуется большой отрицательной величиной $\Delta G^{0\prime}$ (около −7,5 ккал/моль).

Суммарная реакция, описываемая уравнением (1), легко обратима, потому что величина $\Delta G^{0\prime}$ составляет для нее всего −0,20 ккал/моль. Удалось идентифицировать промежуточный продукт этой реакции, образующийся в связанной с ферментом форме. Он оказался *аденилатом жирной кислоты*, т.е. смешанным ангидридом жирной кислоты и АМР (рис. 18-3). Аденилат жирной кислоты образуется в активном центре фермента. Здесь он вступает во взаимодействие со свободным СоА—SH, в результате чего получаются СоА-производное жирной кислоты и АМР.

Пирофосфат, образующийся в ходе активации жирных кислот, может затем гидролизоваться под действием второго фермента – *неорганической пирофосфатазы*:

$$\text{Пирофосфат} + H_2O \rightarrow 2\text{Фосфат} \quad (2)$$
$$\Delta G^{0\prime} = -6{,}9 \text{ ккал/моль.}$$

Поскольку гидролиз пирофосфата в интактных клетках идет практически до

Рис. 18-2. Пальмитоил-СоА. Карбоксильная группа пальмитиновой (16-углеродной) кислоты и тиоловая группа кофермента А взаимодействуют с образованием тиоэфирной связи. Обратите внимание, что СоА-эфиры жирных кислот – это очень большие молекулы.

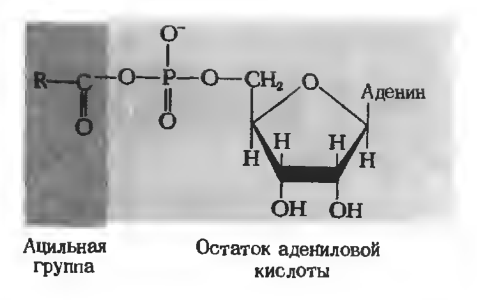


Рис. 18-3. Структура аденилата жирной кислоты. Ацильная группа выделена красным; следует помнить, что эта ацильная группа (остаток жирной кислоты) очень велика по сравнению с аденилатной частью молекулы (см. рис. 18-2).

конца, фермент резко сдвигает равновесие реакции активации (1) вправо, т. е. вынуждает ее идти в сторону образования CoA-производного жирной кислоты. Суммарная реакция, объединяющая реакции (1) и (2), может быть записана в следующем виде:

Жирная кислота + ATP +
+ CoA—SH → Ацил—S—CoA +
+ AMP + $2P_i$

$$\Delta G^{0\prime} = -7{,}1 \text{ ккал/моль}.$$

Позже мы познакомимся с другими примерами, в которых пирофосфатное расщепление ATP (разд. 14.17) с последующим гидролизом пирофосфата тоже используется для активации биомолекул.

CoA-эфиры жирных кислот неспособны проникать через внутреннюю мембрану митохондрий. Однако на наружной поверхности этой внутренней мембраны имеется особый фермент — *карнитин-ацилтрансфераза I*, который катализирует реакцию, представляющую собой второй этап процесса переноса жирных кислот в митохондрии:

Ацил—S—CoA + Карнитин ⇌
⇌ Ацилкарнитин + CoA—SH.

Сложные эфиры карнитина и жирных кислот способны проходить через внутреннюю мембрану митохондрий и проникать в митохондриальный матрикс. В отличие от CoA-эфиров жирных кислот они содержат не тиоэфирную, а кислородно-эфирную связь. Карнитин

$(CH_3)_3N^+—CH_2—CH(OH)—CH_2—COO^-$ Карнитин

Пальмитоил-S-CoA → CoA-SH (Карнитин-ацилтрансфераза)

$(CH_3)_3N^+—CH_2—CH(O—CO—(CH_2)_{14}—CH_3)—CH_2—COO^-$

Кислородно-эфирная связь

Пальмитоильная группа

Пальмитоилкарнитин

Рис. 18-4. Обратимая реакция, катализируемая карнитин-ацилтрансферазой.

(рис. 18-4) обнаружен почти во всех животных и растительных тканях. Известно, что некоторые низшие организмы, например «мучной червь» (*Tenebrio molitor*), не обладают способностью синтезировать карнитин и потому должны получать его с пищей. В организме человека и у других позвоночных карнитин образуется из лизина.

На третьем и последнем этапе процесса поступления жирных кислот в митохондрии остаток жирной кислоты (ацильная группа) переносится от карнитина на внутримитохондриальный CoA при уча-

стии фермента, носящего название *карнитин-ацилтрансферазы II*. Эта форма фермента локализуется на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны; здесь происходит регенерация CoA-производных жирных кислот и отсюда они поступают в матрикс митохондрии:

Ацилкарнитин + CoA—SH ⇄
⇄ Ацил—S—CoA + Карнитин. (3)

Может показаться, что этот трехэтапный процесс [уравнения (1)–(3)], обеспечивающий поступление жирных кислот в митохондрии, излишне сложен. Он, однако, позволяет разделить два пула кофермента А – цитозольный и внутримитохондриальный. Такое разделение необходимо, поскольку эти пулы выполняют разные функции. Митохондриальный пул CoA используется главным образом для окислительного расщепления пирувата, жирных кислот и некоторых аминокислот, тогда как цитозольный пул участвует в биосинтезе жирных кислот. В связи с этим уместно вспомнить, что разделение цитозольного и внутримитохондриального пулов NAD и ATP также обеспечивается внутренней митохондриальной мембраной (разд. 17.2). При этом важно и то обстоятельство, что фермент, катализирующий второй этап этого трехэтапного процесса,– карнитин-ацилтрансфераза I-является регуляторным ферментом. Как мы увидим далее, он регулирует скорость поступления ацильных групп в митохондрии, а следовательно, и скорость окисления жирных кислот.

Теперь CoA-эфиры жирных кислот готовы для того, чтобы их жирнокислотный компонент был подвергнут окислению при помощи ряда специфичных ферментов в матриксе митохондрии.

18.3. Окисление жирных кислот включает две стадии

Процесс окисления жирных кислот в митохондриях состоит из двух главных стадий (рис. 18-5). На первой стадии происходит последовательное отщепление

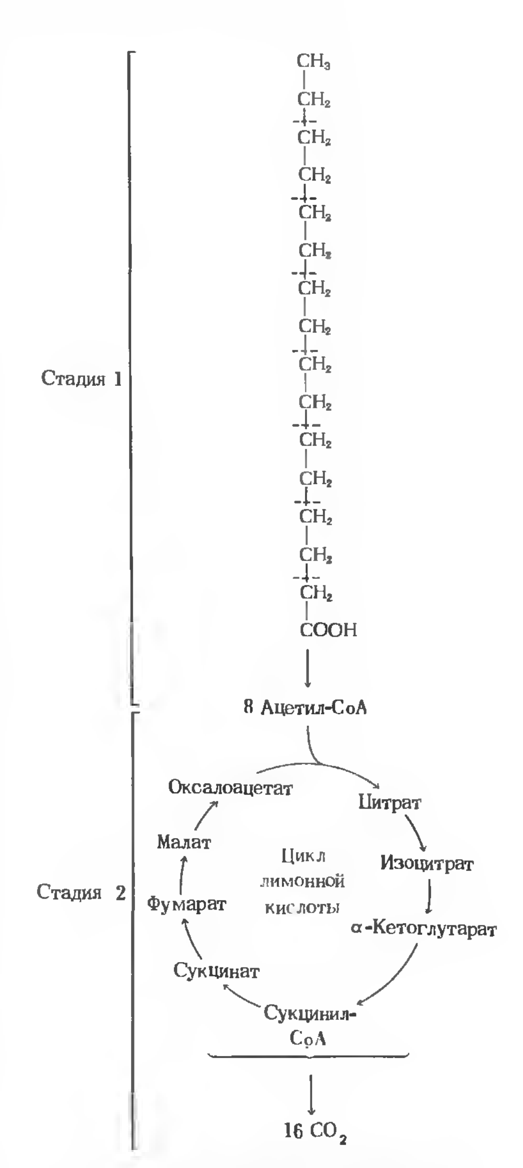


Рис. 18-5. Две стадии окисления жирных кислот. Стадия 1: окисление жирной кислоты с длинной цепью, приводящее к образованию ацетильных групп в форме ацетил-CoA. Стадия 2: окисление ацетильных групп до CO_2.

двухуглеродных фрагментов (в виде ацетил-CoA) от карбоксильного конца цепи жирной кислоты. Каждый двухуглеродный фрагмент отщепляется в результате цикла ферментативных реакций. Например, для расщепления 16-углеродной пальмитиновой кислоты требуется семь таких повторяющихся циклов, в каждом

из которых ферменты «отрезают» от постепенно укорачивающейся цепи жирной кислоты по одному двухуглеродному фрагменту в виде ацетил-СоА. По завершении семи таких циклов остается последний двухуглеродный фрагмент также в виде ацетил-СоА. Общий результат состоит, следовательно, в превращении 16-углеродной цепи пальмитиновой кислоты в восемь двухуглеродных фрагментов в форме ацетильных групп ацетил-СоА. В каждом обороте цикла образование одной молекулы ацетил-СоА сопровождается отщеплением от молекулы жирной кислоты четырех атомов водорода под действием специфичных дегидрогеназ.

На второй стадии окисления жирных кислот эти ацетильные остатки ацетил-СоА окисляются через цикл лимонной кислоты до CO_2 и H_2O. Этот процесс также протекает в митохондриях. Таким образом, ацетил-СоА, образующийся в результате окисления жирных кислот, поступает на общий конечный путь окисления вместе с ацетил-СоА, образующимся из глюкозы через реакцию окисления пирувата (рис. 17-1).

На обеих стадиях окисления жирных кислот атомы водорода или соответствующие им электроны передаются по митохондриальной цепи переноса электронов на кислород. С этим потоком электронов сопряжен процесс окислительного фосфорилирования ADP до ATP. Следовательно, энергия, высвобождающаяся на обеих стадиях окисления жирных кислот, запасается в форме ATP.

Рис. 18-6. Цикл окисления жирных кислот. *А*. В первом обороте цикла от карбоксильного конца пальмитиновой кислоты (C_{16}), вступающей в цикл в форме пальмитоил-СоА, отщепляется в виде ацетил-СоА одна ацетильная группа (выделена красным). *Б*. Шесть следующих оборотов цикла дают еще семь молекул ацетил-СоА (седьмую молекулу образуют два последних атома углерода, оставшиеся от 16-углеродной цепи пальмитиновой кислоты).

18.4. Первая стадия окисления насыщенных жирных кислот состоит из четырех этапов

Ниже рассмотрены четыре ферментативные реакции, составляющие первую стадию окисления жирных кислот.

а. Первая реакция дегидрирования

Поступившие в митохондрии СоА-эфиры насыщенных жирных кислот подвергаются ферментативному дегидриро-

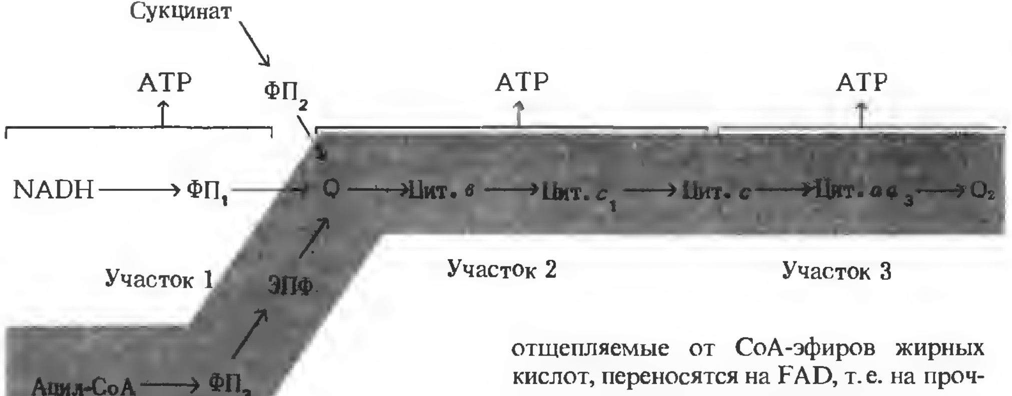


Рис. 18-7. Восстановительные эквиваленты, отщепляемые от CoA-производного жирной кислоты ацил-CoA—дегидрогеназой (флавопротеин 3, или $ФП_3$), передаются через электрон-переносящий флавопротеин (ЭПФ) на убихинон (Q), входящий в состав митохондриальной дыхательной цепи. На каждую пару электронов, переданных от убихинона на кислород, образуются две молекулы ATP. Убихинон, следовательно, собирает электроны от NADH-дегидрогеназы ($ФП_1$), сукцинатдегидрогеназы ($ФП_2$) и ацил-CoA—дегидрогеназы ($ФП_3$).

ванию по α- и β-атомам углерода (т.е. по атомам углерода в положениях 2 и 3), в результате чего в углеродной цепи образуется двойная связь. Продуктом этой реакции, катализируемой *ацил-CoA—дегидрогеназой* (обозначенной в приведенном ниже уравнении буквой E), является *транс*-Δ^2-еноил-CoA. Простетической группой фермента служит FAD:

$$\text{Ацил—S—CoA} + \text{E—FAD} \rightarrow$$

$$\rightarrow \textit{транс}\text{-}\Delta^2\text{-Еноил—S—CoA} + \text{E—FADH}_2.$$

Символом Δ^2 условно обозначают положение двойной связи (рис. 18-6). Важно отметить, что ненасыщенное соединение, образующееся в такой реакции, представляет собой *транс*-изомер; напомним в связи с этим, что двойные связи ненасыщенных жирных кислот, содержащихся в природных соединениях, имеют *цис*-конфигурацию (разд. 12.1). Позже мы еще вернемся к обсуждению этого кажущегося противоречия. Атомы водорода, отщепляемые от CoA-эфиров жирных кислот, переносятся на FAD, т.е. на прочно связанную простетическую группу ацил-CoA—дегидрогеназы. Восстановленная форма ацил-CoA—дегидрогеназы передает затем пару электронов специфическому переносчику электронов, называемому *электронпереносящим флавопротеином* (ЭПФ), который в свою очередь передает ее убихинону, являющемуся составной частью митохондриальной дыхательной цепи (рис. 18-7). В результате последующего переноса этой пары электронов по дыхательной цепи к кислороду образуются две молекулы ATP путем окислительного фосфорилирования ADP (рис. 17-7).

б. Реакция гидратации

На втором этапе цикла окисления жирных кислот происходит гидратация двойной связи *транс*-Δ^2-еноил-CoA, в результате чего образуется L-стереоизомер β-гидрокси(или 3-гидрокси)ацил-CoA. Эта реакция (рис. 18-6) катализируется *еноил-CoA—гидратазой* (которая была получена в кристаллической форме):

$$\textit{транс}\text{-}\Delta^2\text{-Еноил—S—CoA} + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \text{L-3-гидроксиацил—S—CoA}.$$

в. Вторая реакция дегидрирования

На третьем этапе цикла окисления жирных кислот L-3-гидроксиацил-CoA дегидрируется с образованием 3-кетоацил-CoA (рис. 18-6). Катализирует эту реакцию *3-гидроксиацил-CoA—дегидрогеназа*; специфическим акцептором электронов служит NAD^+:

L-3-гидроксиацил—S—CoA + NAD^+ ⇌ 3-кетоацил—S—CoA + NADH + + H^+.

3-гидроксиацил-CoA—дегидрогеназа обладает абсолютной специфичностью в отношении L-стереоизомеров. Образовавшийся в этой реакции NADH передает затем восстановительные эквиваленты NADH-дегидрогеназе дыхательной цепи (рис. 18-7). На каждую пару электронов, переходящих по цепи переноса электронов от NADH к кислороду, образуются три молекулы ATP, как это характерно вообще для всех NAD-зависимых реакций дегидрирования субстрата, протекающих в митохондриях (разд. 17.13).

г. *Реакция тиолитического расщепления*

Последняя (четвертая) реакция цикла окисления жирных кислот катализируется *ацетил-CoA—ацетилтрансферазой* (более известной под названием *тиолаза*). На этом этапе 3-кетоацил-CoA взаимодействует со свободным CoA—SH и расщепляется с образованием, во-первых, двухуглеродного фрагмента, содержащего два концевых углеродных атома исходной жирной кислоты в виде ацетил-CoA, и, во-вторых, CoA-эфира жирной кислоты, укороченной теперь на два атома углерода (рис. 18-6):

3-кетоацил—S—CoA + CoA—SH ⇌ ⇌ Ацил—S—CoA (на два атома углерода короче) + Ацетил—S—CoA.

По аналогии с гидролизом эту реакцию называют *тиолизом*, потому что β-кетоацил-CoA расщепляется в результате его взаимодействия с тиоловой группой CoA (рис. 18-6).

18.5. На первой стадии окисления жирных кислот образуются ацетил-CoA и ATP

Итак, мы закончили рассмотрение одного оборота цикла окисления жирных кислот. Вступивший в этот цикл CoA-эфир жирной кислоты с длинной цепью теряет одну молекулу ацетил-CoA и две пары атомов водорода; по завершении одного оборота цикла цепь жирной кислоты становится на два атома углерода короче. Для CoA-эфира пальмитиновой кислоты (16 атомов углерода) суммарное уравнение одного оборота цикла окисления имеет следующий вид:

Пальмитоил—S—CoA + + CoA—SH + FAD + NAD^+ + + H_2O → Миристоил—S—CoA + + Ацетил—S—CoA + $FADH_2$ + + NADH + H^+.

В результате отщепления одной молекулы ацетил-CoA от пальмитоил-CoA образуется CoA-эфир *миристиновой кислоты*, в молекуле которой содержится уже только 14 атомов углерода. Этот миристоил-CoA вступает в новый цикл окисления, состоящий из тех же четырех реакций; в этом цикле образуется еще одна молекула ацетил-CoA и CoA-эфир гомологичной 12-углеродной лауриновой кислоты – *лауроил-CoA*. Для окисления одной молекулы пальмитоил-CoA с образованием восьми молекул ацетил-CoA требуется семь таких циклов (рис. 18-6):

Пальмитоил—S—CoA + + 7CoA—SH + 7FAD + $7NAD^+$ + + $7H_2O$ → 8Ацетил—S—CoA + + $7FADH_2$ + 7NADH + $7H^+$.

Каждая молекула $FADH_2$, образовавшаяся при окислении жирной кислоты, передает одну пару электронов в дыхательную цепь на уровне убихинона; при переносе этой пары электронов на кислород и сопряженном процессе окислительного фосфорилирования из ADP и фосфата образуются две молекулы ATP (рис. 18-7). В свою очередь каждая образовавшаяся молекула NADH передает одну пару электронов митохондриальной NADH-дегидрогеназе; в результате переноса этой пары электронов на кислород из ADP и фосфата образуются три молекулы ATP. Таким образом, в расчете на каждую отщепляемую молекулу ацетил-CoA образуются пять молекул ATP (имеется в виду цикл в том виде, в каком

он протекает в животных тканях, например в печени или миокарде). Мы можем, следовательно, на примере окисления пальмитоил-CoA до восьми молекул ацетил-CoA написать общее уравнение, которое будет включать также процесс переноса электронов и окислительное фосфорилирование:

Пальмитоил—S—CoA +
+ 7CoA—SH + $7O_2$ + $35P_i$ +
+ 35ADP → 8Ацетил—S—CoA +
+ 35ATP + $42H_2O$ (4)

Это общее уравнение описывает *первую стадию* процесса окисления жирных кислот (рис. 18-5).

18.6. На второй стадии окисления жирных кислот ацетил-CoA окисляется через цикл лимонной кислоты

Ацетил-CoA, образующийся при окислении жирных кислот, ничем не отличается от того ацетил-CoA, который образуется из пирувата. Его ацетильная группа окисляется в конечном счете до CO_2 и H_2O по тому же пути, т.е. через цикл лимонной кислоты (рис. 16-1). Приведенное ниже уравнение выражает баланс второй стадии окисления жирных кислот (рис. 18-5) для случая окисления восьми молекул ацетил-CoA, образовавшихся из пальмитоил-CoA, и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования:

8Ацетил—S—CoA + $16O_2$ +
+ $96P_i$ + 96ADP → 8CoA—SH +
+ 96ATP + $104H_2O$ + $16CO_2$. (5)

Объединив уравнения (4) и (5) для первой и второй стадий окисления жирных кислот, мы получим суммарное уравнение, характеризующее полное окисление пальмитоил-CoA до двуокиси углерода и воды:

Пальмитоил-S-CoA + $23O_2$ +
+ $131P_i$ + 131ADP →
→ CoA—SH + 131ATP +
+ $16CO_2$ + $146H_2O$. (6)

Таблица 18-1. Выход ATP на отдельных окислительных этапах при окислении одной молекулы пальмитоил-CoA до CO_2 и H_2O

Фермент, катализирующий реакцию	NAD-зависимые этапы	FAD-зависимые этапы	Число молекул ATP
Ацил-CoA—дегидрогеназа		7	14
3-гидроксиацил-CoA—дегидрогеназа	7		21
Изоцитратдегидрогеназа	8		24
α-Кетоглутаратдегидрогеназа	8		24
Сукцинил-CoA—синтетаза[1]			8
Сукцинатдегидрогеназа		8	16
Малатдегидрогеназа	8		24
Итого:			131

[1] Предполагается, что образовавшийся GTP взаимодействует с ADP, в результате чего образуется ATP.

В табл. 18-1 указан выход NADH, $FADH_2$ и ATP на отдельных этапах окисления жирных кислот. Изменение стандартной свободной энергии при окислении пальмитиновой кислоты до CO_2 и H_2O составляет около 2340 ккал/моль. При стандартных условиях $7{,}3 \cdot 131 = 956$ ккал из этого количества запасается в форме энергии фосфатной связи ATP. Однако если производить расчет изменений свободной энергии на основе *истинных* концентраций реагирующих веществ и продуктов в условиях клетки, то окажется, что в форме энергии фосфатной связи ATP запасается свыше 80% высвободившейся свободной энергии.

18.7. Окисление ненасыщенных жирных кислот требует двух дополнительных ферментативных этапов

Выше мы описали последовательность реакций при окислении насыщенных жирных кислот, т.е. тех жирных кислот, в углеродной цепи которых имеются

только одинарные связи. Между тем, как мы уже знаем, большая часть жирных кислот, обнаруживаемых в триацилглицеролах и фосфолипидах животных и растений, принадлежит к ненасыщенным и содержит одну или большее число двойных связей (разд. 12.1). Эти двойные связи имеют *цис*-конфигурацию; кроме того, они обычно не занимают в углеродной цепи того специфического положения, в котором только и может их атаковать еноил-CoA—гидратаза – фермент, катализирующий в норме присоединение H_2O по двойной связи Δ^2-еноил-CoA, образующегося при β-окислении жирных кислот.

Существуют, однако, два дополнительных фермента, при наличии которых описанный выше цикл окисления жирных кислот может служить также и для окисления обычных ненасыщенных жирных кислот, используемых клетками в качестве топлива. Действие этих двух ферментов, из которых один представляет собой *изомеразу*, а второй – *эпимеразу*, можно проиллюстрировать на двух примерах. Проследим сначала ход окисления широко распространенной в природе олеиновой кислоты. Это 18-углеродная ненасыщенная жирная кислота с двойной связью между 9-м и 10-м атомами углерода (обозначаемой Δ^9). Олеиновая кислота превращается сначала в *олеил-CoA* (рис. 18-8), который переносится через митохондриальную мембрану в виде *олеилкарнитина*. Последний вновь преобразуется в олеил-CoA в матриксе митохондрий. Таким образом, олеиновая кислота подвергается тем же превращениям, что и рассмотренная выше пальмитиновая кислота. В матриксе из олеил-CoA после трех циклов окисления получаются три молекулы ацетил-CoA и 12-углеродная ненасыщенная жирная кислота с *цис*-двойной связью между 3-м и 4-м атомами углерода (рис. 18-8). На этот продукт не может подействовать следующий фермент обычного цикла окисления жирных кислот, т. е. еноил-CoA—гидратаза, способная атаковать только *транс*-двойные связи. Теперь в действие вступает один из двух дополнительных ферментов, а именно *еноил-CoA—изомераза*. Она катализирует реакцию изомеризации, в результате которой *цис*-Δ^3-еноил-CoA превращается в *транс*-Δ^2-еноил-CoA (рис. 18-9), т. е. в нормальный субстрат еноил-CoA—гидратазы, которая и превращает его в соответствующий L-3-гидроксиацил-CoA. На этот продукт действуют затем остальные ферменты цикла окисления

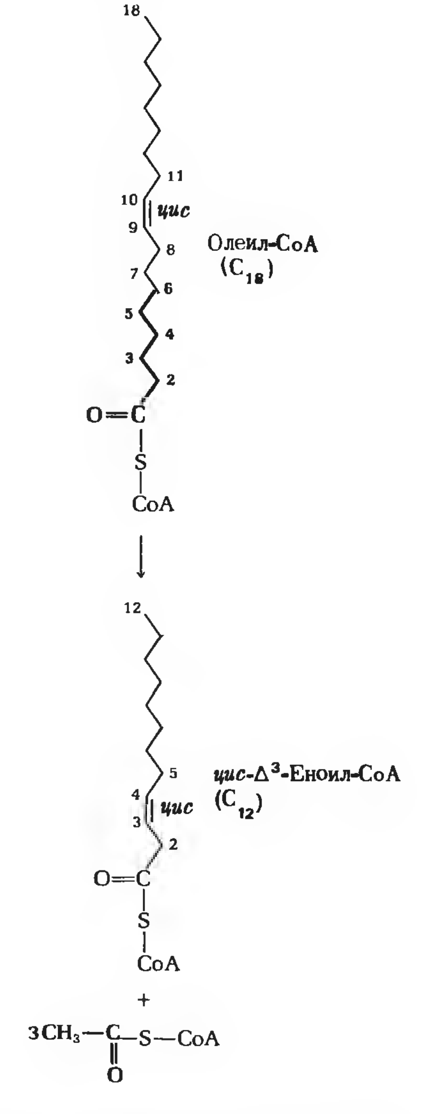


Рис. 18-8. Окислительное отщепление трех молекул ацетил-CoA от олеил-CoA с образованием *цис*-Δ^3-еноил-CoA (12-углеродного соединения).

цис-Δ^3-Еноил-CoA

$O{=}C$–S–CoA

Еноил-CoA—изомераза

транс-Δ^2-Еноил-CoA

$C{=}O$–S–CoA

H_2O Еноил-CoA—гидратаза

3-гидроксиацил-CoA

OH

$C{=}O$–S–CoA

Рис. 18-9. Действие еноил-CoA—изомеразы, катализирующей превращение *цис*-Δ^3-еноил-CoA в *транс*-Δ^2-еноил-CoA. Продукт этой реакции превращается затем в 3-гидроксиацил-CoA.

жирных кислот, в результате чего образуются ацетил-CoA и CoA-эфир 10-углеродной насыщенной жирной кислоты. Этот CoA-эфир 10-углеродной жирной кислоты подвергается дальнейшему окислению в четырех обычных циклах. Таким образом, в конечном счете из одной молекулы 18-углеродной олеиновой кислоты получается девять молекул ацетил-CoA.

Второй из двух дополнительных ферментов—эпимераза—требуется для окисления полиненасыщенных жирных кислот. Примером может служить 18-углеродная линолевая кислота с двумя *цис*-двойными связями, одна из которых расположена между 9-м и 10-м атомами углерода (Δ^9), а другая—между 12-м и 13-м (Δ^{12}). После обычных трех циклов окисления, в которых от линолеил-CoA последовательно отщепляются три молекулы ацетил-CoA, остается CoA-эфир 12-углеродной ненасыщенной жирной кислоты с двумя *цис*-двойными связями—между 3-м и 4-м углеродными атомами (как в случае окисления олеил-CoA) и между 6-м и 7-м. Под действием еноил-CoA—изомеразы *цис*-Δ^3-двойная связь изомеризуется с образованием *транс*-Δ^2-еноил-CoA, который вступает далее в обычную последовательность реакций, дающую в результате одну молекулу ацетил-CoA. В следующем цикле образуются еще одна молекула ацетил-CoA и CoA-эфир 8-углеродной ненасыщенной жирной кислоты с *цис*-Δ^2-двойной связью. На него еноил-CoA—гидратаза *способна* действовать, но продуктом этой реакции оказывается D-стереоизомер 3-гидроксиацил-CoA, а не L-стереоизомер, как при обычном окислении насыщенных жирных кислот. Поэтому здесь вступает в действие второй дополнительный фермент—*3-гидроксиацил-CoA—эпимераза*. Он превращает D-3-гидроксиацил-CoA в L-3-гидроксиацил-CoA (рис. 18-10), который участвует затем в обычных реакциях, приводящих к образованию одной молекулы ацетил-CoA и CoA-эфира 6-углеродной насыщенной жирной кислоты. Последний окисляется затем, как обычно, с образованием еще трех молекул ацетил-CoA. Конечный результат цикла сводится к превращению линолевой кислоты в девять молекул ацетил-CoA при участии двух дополнительных ферментов.

$R—CH_2—C(H)=C(H)—C(=O)—S—CoA$ *цис*-Δ^2-Еноил-CoA

$\downarrow$ H_2O Еноил-CoA—гидратаза

$R—CH_2—C(OH)(H)—CH_2—C(=O)—S—CoA$ D-3-гидроксиацил-CoA

$\downarrow$ 3-гидроксиацил-CoA—эпимераза

$R—CH_2—C(H)(OH)—CH_2—C(=O)—S—CoA$ L-3-гидроксиацил-CoA

Рис. 18-10. Образование D-3-гидроксиацил-CoA и его превращение в L-стереоизомер. Этот L-стереоизомер вступает затем в обычные реакции, составляющие дальнейшие этапы цикла окисления жирных кислот.

18.8. Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода

Хотя бóльшая часть природных липидов содержит жирные кислоты с четным числом атомов углерода, в липидах многих растений и некоторых морских организмов в заметных количествах присутствуют жирные кислоты, молекула которых содержит нечетное число атомов углерода. Кроме того, у крупного рогатого скота и у других жвачных животных при переваривании углеводов в рубце образуются большие количества 3-углеродной *пропионовой кислоты*. Этот пропионат всасывается в кровь и окисляется в печени и других тканях. Жирные кислоты с длинной цепью, содержащей нечетное число атомов углерода, окисляются в той же последовательности реакций, что и кислоты с четным числом атомов, путем отщепления двухуглеродных фрагментов с карбоксильного конца. Однако в последнем цикле окисления субстратом служит ацил-CoA с пятью атомами углерода в ацильной группе. Его окисление и конечное расщепление дает *ацетил-CoA* и *пропионил-CoA*. Ацетил-CoA окисляется, конечно, через цикл лимонной кислоты. Что же касается пропионил-CoA, то он так же, как

$CH_3—CH_2—C(=O)—S—CoA$ Пропионил-CoA

$\downarrow$ HCO_3^-, ATP; Пропионил-CoA—карбоксилаза; $\rightarrow$ AMP + PP_i + H^+

$H—C(COO^-)(CH_3)—C(=O)—S—CoA$ D-метилмалонил-CoA

$\Updownarrow$ Метилмалонил—эпимераза

$CH_3—C(COO^-)(H)—C(=O)—S—CoA$ L-метилмалонил-CoA

$\Updownarrow$ Метилмалонил-CoA—мутаза

$COO^-—CH_2—CH_2—C(=O)—S—CoA$ Сукцинил-CoA

Рис. 18-11. Карбоксилирование пропионил-CoA с образованием D-метилмалонил-CoA и превращение последнего в сукцинил-CoA. См. также рис. 18-12.

и пропионил-CoA из других источников, подвергается не совсем обычным ферментативным превращениям. Сначала пропионил-CoA карбоксилируется с образованием D-стереоизомера метилмалонил-CoA (рис. 18-11) под действием биотинсодержащего фермента, называемого *пропионил-CoA—карбоксилазой*. В этой реакции роль предшественника новой карбоксильной группы играет бикарбонат, а источником энергии для образования новой ковалентной связи служит пирофосфатное расщепление ATP до AMP и пирофосфата:

$$\text{Пропионил-CoA} + \text{ATP} + CO_2 \rightarrow \text{D-метилмалонил-CoA} + \text{AMP} + PP_i.$$

Для реакции требуются также ионы Mg^{2+}. Продукт реакции D-метилмалонил-CoA эпимеризуется (разд. 11.3) под действием *метилмалонилэпимеразы* с образованием соответствующего L-стереоизомера (рис. 18-11):

D-метилмалонил-CoA ⇌ L-метилмалонил-CoA.

L-метилмалонил-CoA в результате совершенно необычной внутримолекулярной перестройки превращается затем в *сукцинил-CoA* (рис. 18-11); эта внутримолекулярная перестройка катализируется *метилмалонил-CoA—мутазой*, которой в качестве кофермента требуется дезоксиаденозилкобаламин – коферментная форма витамина B_{12}, или кобаламина (разд. 10.11):

L-метилмалонил-CoA ⇌ Сукцинил-CoA.

Сукцинил-CoA через цикл лимонной кислоты в конечном счете превращается в оксалоацетат.

Может показаться, что эта последовательность метаболических реакций, в ходе которых из пропионил-CoA образуется сукцинил-CoA,– слишком трудный путь для такого превращения. Вполне можно было бы ожидать образования сукцинил-CoA в результате одного-единственного этапа – присоединения CO_2 к 3-му углеродному атому пропионильной группы пропионил-CoA. Клетки избрали другой путь. Сначала CO_2 присоединяется ко 2-му углеродному атому, да еще и с «неправильной» стороны. После того как эпимераза переместит CO_2 на «правильную» сторону 2-го углеродного атома с образованием L-метилмалонил-CoA, естественным представлялся бы перенос карбоксильной группы от 2-го углеродного атома пропионильной группы к 3-му (рис. 18-12). Вместо этого перемещается такая объемистая группа, как —CO—S—CoA, с участием сложного кофермента – дезоксиаденозилкобаламина. По-видимому, и здесь сложность объясняется тем, что для решения трудной химической задачи клетки избрали обходный путь.

Весьма интересна реакция, катализируемая метилмалонил-CoA—мутазой.

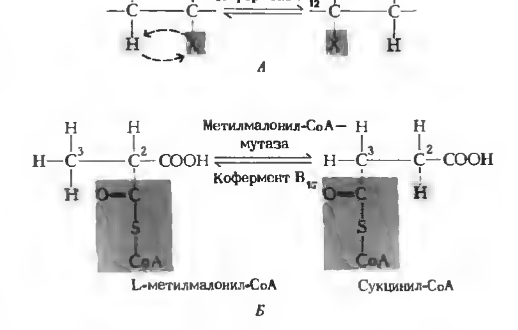


Рис. 18-12. Внутримолекулярная перестройка в реакции, катализируемой метилмалонил-CoA—мутазой. Кофермент B_{12} принимает участие в реакциях, в которых атом водорода обменивается на группу X, связанную с соседним углеродным атомом. *А*. Модель реакции. *Б*. Реакция, катализируемая метилмалонил-CoA—мутазой.

Она заключается в обмене группы —CO—S—CoA (рис. 18-12), присоединенной в исходной пропионильной группе метилмалонил-CoA ко 2-му углеродному атому, на атом водорода, связанный с 3-м атомом углерода. Это одна из тех сравнительно редких ферментативных реакций, в которых алкильная группа (свободная или замещенная) обменивается на атом водорода при соседнем атоме углерода. Все ферменты, катализирующие необычные реакции такого типа, содержат 5′-дезоксиаденозилкобаламин (разд. 10.11). Напомним в связи с этим, что при нарушении всасывания витамина B_{12} в кишечнике развивается злокачественная анемия. Метилмалонил-CoA является промежуточным продуктом не только в процессе окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, но также и в процессе окислительного расщепления трех аминокислот – *метионина*, *валина* и *изолейцина* (разд. 19.7). У человека известен ряд врожденных нарушений обмена метилмалонил-CoA, проявляющихся обычно в раннем детстве. Встречается, например, такой генетический дефект, как понижение или отсутствие активности метилмалонил-CoA—мутазы, при котором метилмалонил-CoA не может превращаться в сукцинил-CoA. Вследствие этого невозможны и все дальнейшие метаболические

превращения метилмалоновой кислоты, так что она в больших количествах появляется в крови и в моче, что приводит к понижению pH крови. Это состояние носит название *метилмалонатной ацидемии.* У некоторых больных удается добиться улучшения, вводя им большие количества витамина B_{12}. Это оказывается возможным в тех случаях, когда генетический дефект проявляется в снижении скорости ферментативной реакции, посредством которой витамин B_{12} превращается в свою активную коферментную форму. Встречаются, однако, и такие больные с метилмалонатной ацидемией, у которых генетический дефект затрагивает белковую часть молекулы метилмалонил-СоА—мутазы. Таким больным введение витамина B_{12} не приносит облегчения; болезнь в этих случаях может привести к смерти.

18.9. Гипоглицин (токсичное вещество, вырабатываемое некоторыми растениями) подавляет окисление жирных кислот

На Ямайке среди бедного населения встречается эндемическое заболевание, которое, как уже давно замечено, связано с употреблением в пищу незрелых плодов *Blighia sapida.* Это заболевание характеризуется гипогликемией (пониженным содержанием сахара в крови) и нарушением обмена жирных кислот. Токсическое действие плодов *Blighia sapida* обусловливается содержащимся в них *гипоглицином,* представляющим собой производное пропионовой кислоты (рис. 18-13). В процессе метаболизма гипоглицин превращается в вещество, которое в форме соответствующего СоА-эфира является мощным и специфическим ингибитором окисления СоА-эфиров жирных кислот с короткой цепью, главным образом бутироил-СоА. В присутствии этого вещества бутироил-СоА гидролизуется с образованием свободного бутирата, который в избытке накапливается в крови и косвенным путем вызывает гипогликемию.

Гипоглицин А

O_2 → NH_3, CO_2

Метиленциклопропилацетат

ATP + CoA-SH → AMP + PP_i

Метиленциклопропилацетил-СоА (мощный ингибитор окисления бутироил-СоА)

Рис. 18-13. Гипоглицин А, присутствующий в иезрелых плодах *Blighia sapida,* превращается ферментативным путем в чрезвычайно мощный ингибитор окисления СоА-эфиров жирных кислот с короткой цепью.

18.10. Образование кетоновых тел в печени и их окисление в других органах

У человека и у большинства других млекопитающих образовавшийся при окислении жирных кислот ацетил-СоА подвергается в печени дальнейшим превращениям по одному из двух путей. Первый из этих путей – окисление через цикл лимонной кислоты – мы уже описали. Второй путь приводит к образованию *ацетоацетата* и D-β-*гидроксибутирата,* которые вместе с *ацетоном* носят название *кетоновых* тел (рис. 18-14). Ацетоацетат и β-гидроксибутират не подвергаются в печени дальнейшему окислению, а доставляются кровью к периферическим тканям, где они окисляются в цикле лимонной кислоты. Первый этап образования ацетоацетата в печени заключается

$CH_3—C(=O)—CH_2—COO^-$

Ацетоацетат

$CH_3—CH(OH)—CH_2—COO^-$

D-β-гидроксибутират

$CH_3—C(=O)—CH_3$

Ацетон

Рис. 18-14. Кетоновые тела.

в конденсации двух молекул ацетил-CoA; эта реакция катализируется тиолазой:

Ацетил—S—CoA + + Ацетил—S—CoA ⇌ ⇌ Ацетоацетил—S—CoA + CoA — SH.

Образовавшийся таким путем ацетоацетил-CoA после отщепления CoA превращается в свободный ацетоацетат в результате двух последовательных реакций (рис. 18-15), описываемых суммарным уравнением:

Ацетоацетил—S—CoA + H_2O → → Ацетоацетат + CoA—SH.

Затем свободный ацетоацетат восстанавливается в обратимой реакции до D-β-гидроксибутирата; эта реакция катализируется одним из митохондриальных ферментов – D-β-гидроксибутиратдегидрогеназой:

Ацетоацетат + NADH + H^+ ⇌ ⇌ D-гидроксибутират + NAD^+.

D-β-гидроксибутиратдегидрогеназа проявляет специфичность в отношении D-стереоизомера и не действует на L-изомеры β-гидроксиацил-CoA (этот фермент не следует путать с L-3-гидроксиацил-CoA—дегидрогеназой; разд. 18.4, в). Ацетоацетат является также предшественником образующегося в небольших количествах ацетона. Будучи нестойким соединением, ацетоацетат теряет свою карбоксильную группу либо самопроизвольно, либо под действием *ацетоацетатдекарбоксилазы*:

$CH_3—C(=O)—CH_2—COO^-$ + H^+ ⟶ $CH_3—C(=O)—CH_3$ + CO_2

Ацетоацетат → Ацетон

$CH_3—C(=O)—CH_2—C(=O)—S—CoA$ Ацетоацетил-CoA

+

$CH_3—CO—S—CoA$ Ацетил-CoA

↓ Гидроксиметилглутарил-CoA—синтаза (H_2O → CoA—SH + H^+)

$^-OOC—CH_2—C(OH)(CH_3)—CH_2—C(=O)—S—CoA$ β-Гидрокси-β-метилглутарил-CoA

↓ Гидроксиметилглутарил-CoA—лиаза

$CH_3—C(=O)—CH_2—COO^-$ Ацетоацетат

+

$CH_3—C(=O)—S—CoA$ Ацетил-CoA

Рис. 18-15. Отщепление CoA от ацетоацетил-CoA. Этот процесс носит название деацилирования. Гидроксиметилглутарил-CoA является также важным промежуточным продуктом биосинтеза холестерола (гл. 21).

Ацетон – летучее соединение. Он накапливается в больших количествах в крови больных сахарным диабетом и придает их дыханию характерный сладковатый запах, который иногда ошибочно принимают за запах спиртного. Свободный ацетоацетат и D-β-гидроксибутират, образовавшиеся в описанных выше реакциях, диффундируют из клеток печени в кровь и доставляются кровью к периферическим тканям.

Смысл образования кетоновых тел за-

ключается в том, что часть ацетил-СоА, получающегося при окислении жирных кислот в клетках печени, избегает здесь дальнейшего окисления и направляется – в форме кетоновых тел – в другие ткани, где и подвергается окислению до CO_2 и H_2O. Образование кетоновых тел – это своего рода «перепускной» путь, один из многих путей, которые печень использует для того, чтобы направлять клеточное топливо в другие области тела. В норме концентрация кетоновых тел в крови очень низка, однако при сахарном диабете, а также во время голодания она может достигать весьма высокого уровня. Подобное состояние, носящее название *кетоза*, возникает тогда, когда скорость образования кетоновых тел в печени превышает способность периферических тканей к их утилизации. При диабете нарушена способность тканей использовать глюкозу крови. Чтобы как-то компенсировать это нарушение, в печени сжигается в качестве топлива больше жирных кислот. Однако это влечет за собой «перепроизводство» кетоновых тел, так как периферические ткани не успевают их окислять.

В периферических тканях D-β-гидроксибутират под действием D-β-гидроксибутиратдегидрогеназы окисляется до ацетоацетата:

$$\text{D-β-гидроксибутират} + NAD^+ \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons \text{Ацетоацетат} + NADH + H^+.$$

Этот ацетоацетат затем активируется, образуя соответствующий СоА-эфир. Остаток СоА переносится на ацетоацетат от сукцинил-СоА (промежуточного продукта в цикле лимонной кислоты; разд. 16.5, г) в реакции, катализируемой *3-кетоацил-СоА—трансферазой*:

$$\text{Сукцинил-S-CoA} + \text{Ацетоацетат} \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons \text{Сукцинат} + \text{Ацетоацетил—S—CoA}.$$

Ацетоацетил-СоА расщепляется тиолазой с образованием ацетил-СоА:

$$\text{Ацетоацетил—S—CoA} +$$
$$+ \text{CoA—SH} \rightleftharpoons 2\text{Ацетил—S—CoA}.$$

Ацетил-СоА вступает затем в цикл лимонной кислоты для окончательного окисления в периферических тканях.

18.11. Регуляция окисления жирных кислот и образования кетоновых тел

В печени дальнейшие превращения СоА-эфиров жирных кислот, образовавшихся в цитозоле, могут пойти по одному из двух главных путей. Один из них представляет собой окисление этих эфиров в митохондриях, а другой – превращение их в триацилглицеролы и фосфолипиды под действием ферментов цитозоля. Какой будет фактическая судьба СоА-эфиров длинноцепочечных жирных кислот, зависит от скорости их поступления в митохондрии. Трехэтапный транспортный процесс, посредством которого отщепившиеся от цитозольных СоА-эфиров жирных кислот ацильные группы проникают через мембрану в митохондриальный матрикс (после присоединения к карнитину), регулирует скорость всего процесса окисления жирных кислот. Если ацильные группы проникли в митохондрии, то они обязательно будут здесь окислены и в конечном счете полностью превратятся в ацетил-СоА.

Карнитин-ацилтрансфераза I, катализирующая перенос ацильных групп от СоА-эфиров жирных кислот на карнитин на наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны, представляет собой аллостерический фермент. Этот фермент специфически ингибируется своим модулятором *малонил-СоА* (рис. 18-16) – метаболитом, о котором мы ранее не упоминали. Малонил-СоА является первым промежуточным продуктом протекающего в цитозоле процесса биосинтеза, в ходе которого из ацетил-СоА образуются жирные кислоты

```
COO⁻
|
CH₂
|
C—S—CoA
‖
O
```

Рис. 18-16. Малонил-СоА – главный аллостерический ингибитор карнитин-ацилтрансферазы I. Малонил-СоА является первым промежуточным продуктом в последовательности биосинтетических реакций, ведущих от ацетил-СоА к жирным кислотам с длинной цепью.

с длинной цепью. Концентрация малонил-СоА повышается, когда животное получает много углеводов, потому что избыток глюкозы, который не может быть окислен или отложен в запас в виде гликогена, превращается в цитозоле в триацилглицеролы и в этой форме сохраняется в организме. Таким образом, окисление жирных кислот «выключается» всякий раз, когда в печени имеется достаточно глюкозы, используемой в качестве топлива, и когда в ней за счет избытка глюкозы активно синтезируются триацилглицеролы. «Выключение» обеспечивается аллостерическим ингибированием процесса поступления ацильных групп в митохондрии.

Судьба ацетил-СоА, который образуется в митохондриях печени в результате окисления жирных кислот, может быть двоякой: он может быть окислен до CO_2 через цикл лимонной кислоты или превращен в кетоновые тела и в этом случае направлен к периферическим тканям. Путь, по которому пойдет его превращение, определяется главным образом наличием достаточного количества оксалоацетата, необходимого для того, чтобы ацетил-СоА мог вступить в цикл лимонной кислоты. При очень низкой концентрации оксалоацетата в цикл лимонной кислоты включается мало ацетил-СоА; такая ситуация благоприятствует образованию кетоновых тел. Обычно концентрация оксалоацетата в организме животного бывает низкой при голодании или при пониженном содержании углеводов в пище. В этом случае скорость окисления жирных кислот возрастает и значительная часть образовавшегося ацетил-СоА превращается – через гидроксиметилглутарил-СоА – в свободный ацетоацетат и D-β-гидроксибутират, которые направляются к периферическим тканям. Здесь кетоновые тела служат главным клеточным топливом и окисляются через цикл лимонной кислоты до CO_2 и H_2O.

Краткое содержание главы

Значительную часть энергии, извлекаемой в процессе окисления, животный организм получает из жирных кислот, входящих в состав липидов. Свободные жирные кислоты сначала активируются путем взаимодействия их с коферментом А, в результате чего на наружной митохондриальной мембране образуются соответствующие СоА-эфиры. Эти СоА-эфиры превращаются затем в эфиры жирной кислоты и карнитина, способные проникать через внутреннюю митохондриальную мембрану в матрикс митохондрии, где из них снова образуются СоА-эфиры жирных кислот. Все последующие этапы окисления жирных кислот, в которых эти жирные кислоты участвуют в форме соответствующих СоА-эфиров, протекают в митохондриальном матриксе. Для того чтобы от карбоксильного конца СоА-эфира насыщенной жирной кислоты могла отщепиться одна молекула ацетил-СоА, требуется четыре ферментативных этапа: 1) дегидрирование 2-го и 3-го атома углерода, катализируемое FAD-зависимыми ацил-СоА—дегидрогеназами; 2) гидратация возникшей в результате дегидрирования *транс*-Δ^2-двойной связи под действием еноил-СоА—гидратазы; 3) дегидрирование образовавшегося L-3-гидроксиацил-СоА, катализируемое NAD-зависимой 3-гидроксиацил-СоА—дегидрогеназой, и 4) расщепление образовавшегося β-кетоацил-СоА, требующее присутствия свободного СоА и осуществляемое тиолазой; эта реакция дает одну молекулу ацетил-СоА и СоА-эфир жирной кислоты, содержащей на два атома углерода меньше, чем исходная жирная кислота. СоА-эфир укороченной жирной кислоты может снова вступить в тот же цикл и утратить в нем еще одну молекулу ацетил-СоА. Из 16-углеродной пальмитиновой кислоты получается таким путем восемь молекул ацетил-СоА, окисляющихся затем до CO_2 через цикл лимонной кислоты. Значительная часть стандартной свободной энергии окисления пальмитиновой кислоты запасается в процессе окислительного фосфорилирования в виде энергии АТР. В окислении ненасыщенных жирных кислот участвуют два дополнительных фермента – еноил-СоА—изомераза и β-гидроксиацил-

CoA—эпимераза, превращающая D-стереоизомеры соответствующих 3-гидроксиацил-CoA в L-стереоизомеры. Жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода окисляются по тому же основному пути, но при их окислении получается одна молекула пропионил-CoA, которая затем карбоксилируется с образованием метилмалонил-CoA. Последний превращается в сукцинил-CoA в результате очень сложной реакции изомеризации, катализируемой метилмалонил-CoA—мутазой, для действия которой необходим кофермент B_{12}. Образующиеся в печени кетоновые тела – ацетоацетат, D-β-гидроксибутират и ацетон – доставляются к другим тканям, превращаются здесь в ацетил-CoA и окисляются через цикл лимонной кислоты. Окисление жирных кислот в печени регулируется скоростью поступления ацильных групп в митохондрии. Специфическая регуляция достигается при помощи малонил-CoA, вызывающего аллостерическое ингибирование карнитин-ацилтрансферазы I. Малонил-CoA – первый промежуточный продукт биосинтеза жирных кислот, протекающего в цитозоле. Когда животное получает пищу, богатую углеводами, окисление жирных кислот подавляется, а их синтез усиливается.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Cunningham E.B. Biochemistry: Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, New York, 1978. В гл. 12 химизм и энзимология окисления жирных кислот описаны более подробно.

Статьи

Greville D.G., Tubbs P.V. Catabolism of Long-Chain Fatty Acids in Mammalian Tissue, Essays Biochem., 4, 155–212 (1968). Один из первых обзоров; важен как основа для дальнейших работ в этой области.

McGarry J.D., Leatherman G.F., Foster D.W. Carnitine Palmitoyltransferase I. The Site of Inhibition of Hepatic Fatty Acid Oxidation by Malonyl-CoA, J. Biol. Chem., 253, 4128–4136 (1978).

Williamson D.H. Recent Developments in Ketone Body Metabolism, Biochem. Soc. Proc., 7, 1313–1321 (1979).

Recent Progress in β-Oxidation of Fatty Acids, Biochem. Soc. Trans, 7, 68–88 (1978). Полезная серия: статьи, написанные высококвалифицированными специалистами, затрагивают различные аспекты окисления жирных кислот и обмена кетоновых тел.

Вопросы и задачи

1. *Энергия, заключенная в триацилглицеролах.* Какая часть молекулы триацилглицеролов содержит больше биологически доступной энергии (в расчете иа один атом углерода): остатки жирных кислот или остаток глицерола? Как можете вы обосновать свой ответ исходя из химической структуры триацилглицеролов?
2. *Запасы топлива в жировой ткани.*
   а) У взрослого человека, вес которого оставляет 70 кг, 15% веса тела приходится на долю триацилглицеролов. Вычислите общий запас топлива (в килокалориях), содержащегося в организме в форме триацилглицеролов.
   б) Как долго мог бы прожить этот человек, если бы единственным источником энергии для его организма было окисление жирных кислот, входящих в состав триацилглицеролов? При этом расчете исходите из того, что суточная потребность взрослого человека в энергии в условиях покоя равна приблизительно 2000 ккал.
   в) Какой будет суточная потеря веса при таком голодании?
3. *Общие этапы цикла окисления жирных кислот и цикла лимонной кислоты.* Аналогичные метаболические превращения часто проходят в клетке через одни и те же ферментативные этапы. Очень сходны, например, этапы окисления пирувата и α-кетоглутарата соответственно до ацетил-CoA и сукцинил-CoA, хотя они и катализируются разными ферментами. На первой стадии окисление жирных кислот проходит через последовательность реакций, очень напоминающую последовательность реакций в цикле лимонной кислоты. Напишите уравнения этих последовательностей реакций, общих для обоих указанных метаболических путей.
4. *Химизм ацил-CoA-синтетазной реакции.* Жирные кислоты превращаются в соответствующие CoA-эфиры в следующей обратимой реакции:

$$R\text{—COOH} + \text{ATP} + \text{CoA-SH} \rightleftharpoons R\text{—}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{—S—CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

а) Связанный с ферментом промежуточный продукт этой реакции был идентифицирован как смешанный ангидрид жирной кислоты и аденозинмонофосфата (AMP)

$$R-\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}-O-\underset{\underset{\large ^{-}O}{|}}{\overset{\overset{\large O}{\|}}{P}}-O-CH_2-\text{(рибоза: H, H, H, H; HO, OH)}-\text{Аденин}$$

Ацил-AMP

Напишите два уравнения для двух последовательных этапов ацил-СоА-синтетазной реакции, в которой промежуточным продуктом служит ацил-AMP.

б) Изображенная выше реакция легко обратима; ее константа равновесия близка к 1. Как заставить реакцию идти в сторону образования AMP? В каких условиях будет накапливаться

$$R-\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}-S-CoA?$$

5. *Окисление меченного тритием пальмитата.* Равномерно меченный тритием (^3H) пальмитат с удельной активностью $2{,}48 \cdot 10^8$ имп./мин/мкмоль добавили к препарату митохондрий, способному окислять его до ацетил-СоА. Затем ацетил-СоА выделили и подвергли гидролизу, в результате чего был получен ацетат. Удельная активность выделенного ацетата оказалась равной $1{,}00 \cdot 10^7$ имп./ /мин/мкмоль. Можно ли на основании этих данных считать, что здесь происходило β-окисление? Поясните свой ответ. Какова конечная судьба удаленного трития?

6. *Жирные кислоты как источник воды.* Вопреки распространенному мнению горб верблюда вовсе не хранит в себе запаса воды; это просто большой запас жира. Как может этот жир служить источником воды? Вычислите количество воды (в литрах), которое может образоваться в теле верблюда из 1 кг жира. При этом для простоты исходите из того, что весь этот жир представлен трипальмитином.

7. *Нефть как пища для микроорганизмов.* Некоторые микроорганизмы, принадлежащие к родам *Nocardia* и *Pseudomonas*, способны расти в условиях, где единственной их пищей служит нефть. Эти бактерии окисляют алифатические углеводороды с неразветвленной цепью до соответствующих карбоновых кислот, например:

$$NAD^+ + CH_3(CH_2)_6CH_3 + O_2 \longrightarrow CH_3(CH_2)_6C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow OH\end{matrix} + H^+ + NADH$$

Октан

Как можно использовать эти бактерии для ликвидации нефтяных загрязнений?

8. *Обмен фенилированной жирной кислоты с неразветвленной цепью.* Из мочи кролика, получавшего с пищей жирную кислоту с неразветвленной цепью, меченную фенильной группой по концевому атому углерода,

$$C_6H_5-CH_2(CH_2)_nCOOH$$

был выделен в кристаллическом виде какой-то метаболит. Водный раствор этого метаболита имел кислую реакцию. Для полной нейтрализации пробы, содержавшей 302 мг данного метаболита, потребовалось 22,2 мл 0,1 М NaOH.

а) Какова вероятная молекулярная масса и структура этого метаболита?

б) Содержит ли жирная кислота, которую скармливали кролику, четное или нечетное число метиленовых ($-CH_2-$) групп, т. е. является ли *n* четным или нечетным? Аргументируйте свой ответ.

9. *Окисление жирных кислот у больных диабетом.* Когда при β-окислении в печени образуется больше ацетил-СоА, чем может быть окислено через цикл лимонной кислоты, избыток ацетил-СоА направляется на образование кетоновых тел — ацетоацетата, D-β-гидроксибутирата и ацетона. Именно такое положение существует при тяжелой форме диабета, потому что ткани таких больных неспособны утилизировать глюкозу и вместо этого окисляют большие количества жирных кислот. Хотя ацетил-СоА и нетоксичен, в митохондриях его избыток все же должен переводиться в кетоновые тела. Почему? Каким образом это разрешает возникающую проблему?

10. *Последствия от пребывания на рационе с высоким содержанием жиров, но без углеводов.* Представьте себе, что вам пришлось бы питаться китовым и тюленьим жиром, а углеводов вы бы при этом почти или даже совсем не получали.

а) Как сказалось бы это отсутствие углеводов в рационе на использовании жиров в качестве источника энергии?

б) При полном отсутствии углеводов в рационе какие жирные кислоты организму выгоднее потреблять – с четным или нечетным числом атомов углерода? Почему?

11. *Образование ацетил-СоА из жирных кислот.* Напишите сбалансированное суммарное уравнение для образования ацетил-СоА из следующих соединений (в уравнении должны быть учтены все этапы активации);

а) миристоил-СоА;

б) стеариновая кислота;

в) D-β-гидроксимасляная кислота.

12. *Путь меченых атомов при окислении жирных кислот.* Пальмитиновая кислота, меченная ^{14}C в положении 9, окисляется в условиях, в которых действует цикл лимонной кислоты. В каком положении обнаружится ^{14}C а) в ацетил-СоА, б) в лимонной кислоте и в) в бутирил-СоА? (Исходите в своем ответе из одного оборота цикла лимонной кислоты.)

13. *Суммарное уравнение для полного окисления β-гидроксимасляной кислоты.* Напишите суммарное уравнение для полного окисления β-гидроксимасляной кислоты в почках. Уравнение должно учитывать все необходимые этапы активации и все реакции окислительного фосфорилирования.

ГЛАВА 19

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ. ЦИКЛ МОЧЕВИНЫ

Бо́льшую часть метаболической энергии, вырабатываемой в тканях, поставляют процессы окисления углеводов и триацилглицеролов; у взрослого мужчины до 90% всей потребности в энергии покрывается из этих двух источников. Остальную энергию (в зависимости от рациона от 10 до 15%) дает окисление аминокислот.

Хотя роль аминокислот в организме определяется в первую очередь тем, что они служат строительными блоками для биосинтеза белков, в известных условиях они могут претерпевать и окислительное расщепление. Это возможно в трех случаях. 1) Если аминокислоты, высвобождающиеся при обычном динамическом обновлении белков, не используются для синтеза новых белков, то они подвергаются окислительному расщеплению. 2) Если организм получает с пищей больше аминокислот, чем это ему необходимо для белкового синтеза, то избыточное их количество расщепляется, потому что аминокислоты не откладываются в организме в запас. 3) Во время голодания или при сахарном диабете, т. е. тогда, когда углеводов нет или когда их утилизация нарушена, в качестве топлива используются белки. Во всех этих ситуациях аминокислоты теряют свои аминогруппы и превращаются в соответствующие α-кетокислоты, которые затем окисляются до CO_2 и воды; частично это окисление идет через цикл лимонной кислоты.

В этой главе мы познакомимся с метаболическими путями, по которым идет окислительное расщепление двадцати обычных аминокислот, входящих в состав белков. Мы узнаем также, что у разных видов животных отщепляемый от аминокислот аммиак выводится из организма в различной химической форме.

19.1. Перенос α-аминогрупп катализируется трансаминазами

α-Аминогруппы двадцати обычных L-аминокислот, обнаруживаемых в белках, отщепляются на одной из стадий окислительного расщепления аминокислот. Если эти аминогруппы не используются повторно для синтеза новых аминокислот или других азотсодержащих соединений, то они собираются в одной форме, превращаются в конце концов в один общий конечный продукт и в таком виде выводятся из организма. У человека и у большинства других наземных позвоночных таким конечным продуктом является *мочевина*. Отщепление α-аминогрупп от большей части L-аминокислот катализируется ферментами, которые называются *трансаминазами* или *аминотрансферазами*. В таких ферментативных реакциях трансаминирования α-аминогруппа переносится от аминокислоты на α-углеродный атом α-кетоглутарата, в результате чего образуется α-кетоаналог исходной аминокислоты и L-глутамат, представляющий собой продукт аминирования α-кетоглутарата (рис. 19-1).

$$\text{L-}\alpha\text{-аминокислота} + \alpha\text{-Кетоглутарат} \rightleftharpoons \alpha\text{-Кетокислота} + \text{L-глутамат.}$$

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{R_1}{\overset{COO^-}{C}}-H$$ L-аминокислота

+

$$COO^- - C{=}O - CH_2 - CH_2 - COO^-$$ α-Кетоглутарат

⇅ Трансаминаза (пиридоксальфосфат)

$$COO^- - C{=}O - R_1$$ α-Кетокислота

+

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{CH_2-CH_2-COO^-}{\overset{COO^-}{C}}-H$$ L-глутамат

Рис. 19-1. Реакция трансаминирования. Переносимая аминогруппа выделена красным. В большей части реакций трансаминирования акцептором аминогрупп служит α-кетоглутарат.

Отметим, что реального дезаминирования, т.е. потери аминогрупп, в таких реакциях не происходит, поскольку дезаминирование α-аминокислоты сопровождается аминированием α-кетоглутарата. Смысл трансаминирования состоит в его *коллекторной* функции, иными словами, в том, что аминогруппы от многих разных аминокислот собираются в одной форме – в виде L-глутаминовой кислоты. Таким образом, катаболизм различных аминокислот приводит в конечном итоге к одному-единственному продукту.

Большинство трансаминаз проявляет специфичность в отношении акцептора аминогрупп: таким акцептором в приведенной выше реакции служит для них α-кетоглутарат. Менее специфичны трансаминазы в отношении другого субстрата, т.е. той аминокислоты, которая играет роль донора аминогрупп. Ниже приведено несколько реакций, в которых участвуют наиболее важные трансаминазы (в названии ферментов указывается аминокислота, играющая роль донора аминогрупп):

L-аланин + α-Кетоглутарат ⇌ (Аланин-трансаминаза) Пируват + L-глутамат,

L-аспартат + α-Кетоглутарат ⇌ (Аспартат-трансаминаза) Оксалоацетат + L-глутамат,

L-лейцин + α-Кетоглутарат ⇌ (Лейцин-трансаминаза) α-Кетоизокапроат + L-глутамат,

L-тирозин + α-Кетоглутарат ⇌ (Тирозин-трансаминаза) *п*-Гидроксифенил-пируват + L-глутамат.

Итак, общим акцептором, принимающим аминогруппу от большинства аминокислот, является α-кетоглутарат. Образовавшийся L-глутамат служит для того, чтобы направлять аминогруппы на определенные биосинтетические пути (гл. 22) и в ту конечную последовательность реакций, посредством которой образуются продукты азотистого обмена, выводимые затем из организма. Реакции, катализируемые трансаминазами, легко обратимы, поскольку их константы равновесия близки к 1,0. Это означает, что величина $\Delta G^{0\prime}$ для таких реакций близка к нулю (разд. 14.3).

У всех трансаминаз имеется прочно связанная простетическая группа, и механизм их действия одинаков. Простетической группой трансаминаз служит *пиридоксальфосфат* – производное пиридоксина, или витамина B_6 (разд. 10.8). Пиридоксальфосфат действует как про-

Пиридоксальфосфат

А

Пиридоксаминфосфат

Б

Приходящая аминокислота 1

Уходящая α-кетокислота 1

Приходящая α-кетокислота 2

Уходящая аминокислота 2

В

Рис. 19-2. Простетическая группа трансаминаз. Пиродоксальфосфат (*А*) и его аминированная форма – пиридоксаминфосфат (*Б*) – это прочно связанные коферменты трансаминаз. Функциональные группы, от которых зависит их действие, показаны на красном фоне. *В*. Пиридоксальфосфат играет роль промежуточного переносчика аминогрупп при действии трансаминаз. *Е* означает здесь ферментный белок, а – прочно связан-

$$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}COO^- + H^+ \longrightarrow CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}H + CO_2$$

Пируват Ацетальдегид

ный пиридоксальфосфат.

Трансаминазы катализируют бимолекулярные реакции, протекающие по механизму типа «пинг-понг». Первый субстрат – α-аминокислота 1, отдав свою аминогруппу, покидает фермент в виде α-кетокислоты до того, как к ферменту присоединится второй субстрат – α-кетокислота 2.

межуточный переносчик аминогрупп в активном центре трансаминаз (рис. 19-2). Во время каталитического цикла он претерпевает обратимые переходы между альдегидной формой (*пиридоксальфосфат*), способной присоединять аминогруппы, и аминированной формой (*пиридоксаминфосфат*), способной передавать аминогруппы на α-кетоглутарат. Таким образом, эта простетическая группа действует как обратимый переносчик аминогрупп от α-аминокислоты на α-кетоглутарат (рис. 19-2). Трансаминазы – классический пример ферментов, катализирующих бимолекулярные реакции, протекающие по механизму типа «пинг-понг» (разд. 9.8). В таких реакциях первый субстрат должен уйти из активного центра фермента до того, как второй субстрат сможет к нему присоединиться. Сначала с активным центром фермента связывается приходящая аминокислота, которая отдает свою аминогруппу пиридоксальфосфату и в форме α-кетокислоты покидает активный центр. Затем с активным центром связывается приходящая α-кетокислота; она принимает аминогруппу от пиридоксаминфосфата и отделяется от активного центра, теперь уже в форме аминокислоты.

На рис. 19-3 видно, что карбонильная группа связанного с ферментом пиридоксальфосфата взаимодействует с α-аминогруппой приходящей аминокислоты, в результате чего образуется промежуточный продукт, представляющий собой ковалентное соединение – *шиффово осно-*

А

Приходящая α-аминокислота 1

В

Б

Г

Уходящая α-кетокислота 1 (или приходящая α-кетокислота 2 в обратной реакции)

Рис. 19-3. Схема, поясняющая действие пиридоксальфосфата в трансаминазах. Аминогруппа приходящей α-аминокислоты (*А*) взаимодействует с карбонильной группой пиридоксальфосфата, прочно связанного с ферментом. При этом в качестве промежуточного продукта образуется шиффово основание (*Б*), которое переходит затем в свою таутомерную форму (*В*). Последняя гидролизуется с образованием соответствующей α-кетокислоты, которая удаляется, в то время как аминогруппа остается ковалентно связанной с трансаминазой в форме пиридоксаминфосфата (*Г*). Поскольку эти реакции обратимы, аминированная форма трансаминазы передает затем свою аминогруппу на приходящую α-кетокислоту 2, в результате чего образуется новая аминокислота.

вание. Затем происходит сдвиг двойной связи C=N и гидролитическое отщепление углеродного скелета аминокислоты; при этом ее аминогруппа остается ковалентно связанной с простетической группой в форме пиридоксаминфосфата. Пиридоксаминфосфат образует теперь шиффово основание с приходящим α-кетоглутаратом, на который и переносится аминогруппа; перенос совершается, по сути, путем обращения тех реакций, в которых образовался пиридоксаминфосфат.

В медицине определение аланин-трансаминазы и аспартат-трансаминазы в сыворотке крови служит важным методом диагностики и оценки результатов лечения при инфаркте миокарда. Этот же метод используется и для обнаружения токсического действия некоторых химических реактивов (дополнение 19-1).

19.2. Аммиак образуется из глутамата

Мы уже видели, что почти все α-аминокислоты отдают свои аминогруппы в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом, приводящей к образованию L-глутамата. Каким образом эти аминогруппы отщепляются от глутамата и в какой форме они выводятся из организма?

Дополнение 19-1. Определение содержания трансаминаз и других ферментов в крови используется в медицине для диагностики

Аланин-трансаминаза (называемая также глутамат-пируват—трансаминазой, ГПТ) и аспартат-трансаминаза (называемая также глутамат-оксалоацетат—трансаминазой, ГОТ) играют важную роль в диагностике заболеваний сердца и печени. Тромбоз какой-либо из ветвей коронарной артерии вызывает местную аноксию и в конечном итоге отмирание одного из участков сердечной мышцы, так называемый *инфаркт миокарда.* При этом заболевании аланин-трансаминаза и аспартат-трансаминаза вместе с другими ферментами выходят из поврежденных клеток миокарда и попадают в кровоток. Определение в сыворотке крови концентрации этих двух трансаминаз и еще одного фермента миокарда, креатинкиназы, может дать ценную информацию о степени тяжести и о стадии повреждения сердечной мышцы. Креатинкиназа – первый фермент миокарда, появляющийся в крови после приступа ишемической болезни. Он также быстро исчезает из крови. Во вторую очередь появляется ГОТ, а затем ГПТ. Из поврежденных клеток миокарда или из клеток, испытывающих недостаток кислорода, выходит наружу и попадает в кровоток также и лактатдегидрогеназа.

Определение ГОТ и ГПТ в сыворотке крови играет важную роль и в диагностике профзаболеваний. Таким путем выявляются повреждения печени у лиц, работающих с различными органическими растворителями (четыреххлористым углеродом, хлороформом и т. п.), применяемыми в химической и других отраслях промышленности, а также, например, для сухой чистки одежды. Эти растворители вызывают дегенерацию ткани печени, в результате чего из поврежденных клеток поступают в кровь различные ферменты. Удобнее всего при систематических анализах крови у лиц, соприкасающихся с такими химическими веществами, определять содержание трансаминаз, так как активность этих ферментов в печени очень высока и даже самые малые их количества легко поддаются обнаружению.

Определение уровня различных ферментов в сыворотке крови служит источником важной информации при целом ряде заболеваний.

Окислительное дезаминирование глутамата катализируется *L-глутаматдегидрогеназой*, для которой акцептором восстановительных эквивалентов служит NAD^+:

$$\text{L-глутамат}^- + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons \alpha\text{-Кетоглутарат}^{2-} + NH_4^+ + NADH + H^+.$$

Этот фермент присутствует только в митохондриях, где он содержится в матриксе. Именно глутаматдегидрогеназа ответственна за бóльшую часть аммиака, образующегося в животных тканях, потому что глутамат – это единственная аминокислота, способная таким путем с большой скоростью отщеплять свою α-аминогруппу. Понятно поэтому, что глутамат и глутаматдегидрогеназа играют совершенно особую роль в обмене аминогрупп.

Глутаматдегидрогеназа – сложный аллостерический фермент. Молекулярная масса глутаматдегидрогеназы равна приблизительно 300 000. Молекула этого фермента состоит из шести идентичных субъединиц, каждая из которых представляет собой одну полипептидную цепь, построенную из 500 аминокислотных остатков. Положительным модулятором фермента, оказывающим на него сильное активирующее действие, служит ADP и ингибитором – GTP (продукт сукцинил-СоА-синтетазной реакции в цикле лимонной кислоты; разд. 16.5, д). Всякий раз, когда клеткам печени требуется больше

топлива для цикла лимонной кислоты, с тем чтобы они могли образовать больше ATP, активность глутаматдегидрогеназы повышается, вследствие чего появляется α-кетоглутарат, который может быть использован в цикле лимонной кислоты, и высвобождается аммиак – для выведения из организма. Если же в митохондриях в результате усиленной работы цикла лимонной кислоты накапливается GTP, то окислительное дезаминирование глутамата подавляется.

Аммиак может и сохраняться, а затем использоваться для синтеза аминокислот. В этом случае глутаматдегидрогеназа действует в обратном направлении, т. е. катализирует восстановление аммиака и α-кетоглутарата с образованием глутамата. Эта реакция, однако, не является простым обращением NAD-зависимой реакции, представленной выше; вместо NAD в ней участвует NADP:

$$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{NH}_4^+ + \alpha\text{-Кетоглутарат}^{2-} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{Глутамат}^- + \text{H}_2\text{O}.$$

То обстоятельство, что глутаматдегидрогеназа использует разные коферменты для отщепления и присоединения аммиака, обеспечивает независимую регуляцию этих двух реакций – дезаминирования глутамата и аминирования α-кетоглутарата, хотя обе реакции катализируются одним и тем же ферментом.

Обратимся теперь в соответствии с темой предыдущих глав к рассмотрению окислительных путей, на которые направляются дезаминированные аминокислоты. Речь пойдет о катаболических путях, обеспечивающих окисление главных питательных веществ и их использование в качестве источника энергии. Позже мы еще вернемся к вопросу о судьбе аминогрупп.

19.3. Существует 20 различных путей для расщепления углеродных скелетов аминокислот

В состав белков входит 20 обычных аминокислот, различающихся своими углеродными скелетами. Соответственно существует и 20 различных катаболических путей для их расщепления. Из общего количества энергии, потребляемой организмом, на долю всех этих путей приходится не более 10%. Это значит, что участие каждой из аминокислот в общем метаболизме выражается в среднем величиной порядка 0,5%. Ясно, таким образом, что значение этих аминокислотных путей, взятых по отдельности, не может идти ни в какое сравнение со значением гликолиза или цикла лимонной кислоты. Поэтому мы не будем рассматривать их подробно. Дело в том, что 20 различных катаболических путей, по которым идет расщепление аминокислот, в конечном счете сливаются и приводят всего лишь к пяти продуктам, которые затем вступают в цикл лимонной кислоты и здесь окисляются полностью до CO_2 и H_2O (рис. 19-4).

На рис. 19-4 видно, что углеродные скелеты десяти аминокислот разрушаются с образованием *ацетил-СоА*. Пять аминокислот превращаются в *α-кетоглутарат*, три – в *сукцинил-СоА*, две – в *оксалоацетат* и две – в *фумарат*. Индивидуальные пути для 20 аминокислот мы объединим здесь в схемы, в каждой из которых эти пути будут вести к определенному продукту, способному включиться в цикл лимонной кислоты. (Углеродные атомы, которым предстоит включиться в цикл лимонной кислоты, выделены на схемах красным.) Некоторые ферментативные этапы этих путей, представляющие особый интерес либо из-за своеобразного механизма реакции, либо из-за того, что они важны с медицинской точки зрения, мы обсудим отдельно.

19.4. Десять аминокислот превращаются в результате расщепления в ацетил-СоА

Углеродные скелеты десяти аминокислот, разрушаясь, превращаются в ацетил-СоА, непосредственно включающийся в цикл лимонной кислоты. Пять из этих десяти аминокислот расщепляются до ацетил-СоА через *пируват*; другие пять превращаются сначала в *ацетоацетил-СоА*, а затем уже этот последний

Рис. 19-4. Включение углеродных скелетов обычных аминокислот в цикл лимонной кислоты. При расщеплении лейцина и триптофана образуется как ацетоацетил-СоА, так и ацетил-СоА.

Аланин
Треонин
Глицин
Серин
Цистеин

Пируват

Ацетил-СоА

Ацетоацетил-СоА

Фенилаланин
Тирозин
Лейцин
Лизин
Триптофан

Аргинин
Гистидин
Глутамин
Пролин

Глутамат

Изоцитрат

α-Кетоглутарат

Цитрат

Цикл лимонной кислоты

Сукцинил-СоА

Изолейцин
Метионин
Валин

Сукцинат

Оксалоацетат

Фумарат

Малат

Аспартат
Аспарагин

Фенилаланин
Тирозин

расщепляется до ацетил-СоА (рис. 19-4). Через пируват идет расщепление *аланина, цистеина, глицина, серина* и *треонина* (рис. 19-5). Аланин превращается в пируват непосредственно в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом. Четырехуглеродная аминокислота треонин расщепляется с образованием двухуглеродной аминокислоты глицина, который может подвергаться дальнейшим превращениям по двум путям. На одном из них глицин сначала превращается в серин (трехуглеродную аминокислоту) в результате ферментативного присоединения гидроксиметильной группы, переносчиком которой служит кофермент *тетрагидрофолат* (рис. 19-6). Из предыдущего мы уже знаем (разд. 10.10), что тетрагидрофолат выступает в роли переносчика одноуглеродных групп, таких, как метильная, формильная, гидроксиметильная и формиминогруппа (рис. 19-6). Однако главный путь катаболизма глицина ведет через другую реакцию, также требующую присутствия тетрагидрофолата. В этой реакции происходит окис-

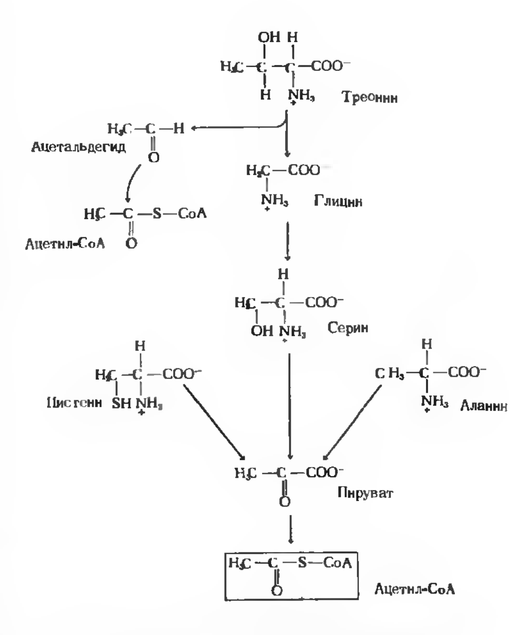


Рис. 19-5. Схема путей, ведущих от треонина, глицина, серина, цистеина и аланина к ацетил-СоА через пируват.

Рис. 19-6. *А*. Тетрагидрофолат (FH_4). Часть молекулы, участвующая в переносе одноуглеродной группы, показана на красном фоне.
Б. N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат, образующийся в глицин-синтазной реакции. Метиленовая группа показана на красном фоне.

лительное расщепление глицина до CO_2, NH_4^+ и метиленовой группы (—CH_2—), которая присоединяется к тетрагидрофолату. Реакция легко обратима; катализируется она *глицин-синтазой*:

$$H_3\overset{+}{N}—CH_2—COO^- + FH_4 + NAD^+ \rightleftharpoons N^5,N^{10}\text{-метилен-}FH_4 + CO_2 + NADH + NH_4^+.$$

На этом катаболическом пути два углеродных атома глицина не поступают в цикл лимонной кислоты. Один из них отщепляется в виде CO_2, а второй используется для образования метиленовой группы N^5N^{10}-метилентетрагидрофолата (рис. 19-6), который служит донором метиленовых групп в некоторых биосинтетических реакциях.

Фрагменты углеродного скелета *фенилаланина*, *тирозина*, *лизина*, *триптофана* и *лейцина* превращаются в *ацетоацетил-СоА*, из которого затем образуется ацетил-СоА (рис. 19-7).

Особого внимания заслуживают в этой группе два катаболических пути. Путь, ведущий от триптофана к ацетил-СоА,– самый сложный в аминокислотном катаболизме животных тканей: он включает 13 этапов. Некоторые промежуточные продукты катаболизма триптофана служат предшественниками в биосинтезе других важных биомолекул, например нейрогормона *серотонина* или такого витамина, как *никотиновая кислота* (рис. 19-8). Таким образом, путь, по которому идет катаболизм триптофана, имеет несколько ответвлений, что создает возможность для образования ряда других продуктов из единственного предшественника – триптофана.

Второй интересный путь – это путь, ведущий от фенилаланина (рис. 19-9). Фенилаланин и продукт его окисления тирозин распадаются на два фрагмента; оба они могут вступать в цикл лимонной кислоты, хотя и на разных уровнях. Четыре из девяти углеродных атомов фенилаланина и тирозина дают свободный ацетоацетат, который затем превращается в ацетил-СоА (рис. 19-7). Второй четырехуглеродный фрагмент тирозина и фенилаланина превращается в *фумарат* – промежуточный продукт цикла лимонной кислоты (см. ниже). Таким образом, восемь из девяти атомов этих

Рис. 19-7. Схема путей, ведущих от лизина, триптофана, фенилаланина, тирозина и лейцина к ацетил-СоА через ацетоацетил-СоА.

Триптофан

Никотинат (витамин)

Серотонин (гормон, вызывающий сужение сосудов)

Индолацетат (образуется в растениях; стимулирует рост растений)

Рис. 19-8. Триптофан и некоторые важные продукты его метаболических превращений.

Фенилаланин

O_2, NADPH, H^+ → H_2O, $NADP^+$ — Фенилаланин-монооксигеназа — Дефектна при фенилкетонурии

Тирозин

α-Кетоглутарат → Глутамат — Тирозин-трансаминаза

4-гидроксифенилпируват

O_2 → CO_2 — 4-гидроксифенилпируват-диоксигеназа

Гомогентизат

O_2 → H^+ — Гомогентизат-1,2-диоксигеназа — Дефектна при алкаптонурии

$^-OOC-CH=CH-CO-CH_2-CO-CH_2-COO^-$

4-малеилацетоацетат

4-малеилацетоацетат

Малеилацетоацетат-изомераза

$^-OOC-CH=CH-CO-CH_2-CO-CH_2-COO^-$ 4-фумарилацетоацетат

H_2O → H^+ — Фумарилацетоацетаза

$CH_3-CO-CH_2-COO^-$ Ацетоацетат

Фумарат

Сукцинил-CoA → Сукцинат — 3-кетоацил-CoA-трансфераза

$CH_3-CO-CH_2-CO-S-CoA$ Ацетоацетил-CoA

Рис. 19-9. Нормальный путь превращения фенилаланина и тирозина в ацетоацетил-CoA и фумаровую кислоту. При фенилкетонурии нарушена активность первого фермента этого пути.

аминокислот поступают в цикл лимонной кислоты; девятый атом отщепляется в виде CO_2. Фенилаланин (после гидроксилирования, т.е. через тирозин) также в конечном счете используется как предшественник гормона щитовидной железы *тироксина* и двух гормонов, вырабатываемых мозговым веществом надпочечников – *адреналина* и *норадреналина* (гл. 25).

19.5. Наследственные нарушения катаболизма фенилаланина

У человека известно много различных наследственных нарушений аминокислотного обмена. В основе всех этих нарушений (большинство из них встречается редко) лежит мутация какого-нибудь гена, кодирующего определенный фермент, участвующий в превращениях данной аминокислоты. Под контролем мутантного гена синтезируется дефектный фермент, у которого в том или ином ключевом участке полипептидной цепи может стоять «неправильная» аминокислота; кроме того, какой-нибудь аминокислотный остаток может быть утрачен или, наоборот, включен в полипептидную цепь. В одних случаях такой наследственно измененный фермент неактивен вообще, а в других проявляет лишь часть присущей ему активности, поскольку характерное для него значение K_M (или V_{max}) не соответствует норме. Большинство врожденных нарушений аминокислотного обмена у человека сопряжено с накоплением тех или иных промежуточных продуктов этого обмена. При некоторых наследственных заболеваниях такого рода нарушается нормальное развитие нервной ткани, что приводит к умственной отсталости.

Фенилаланин-тирозиновый путь заслуживает в этом смысле специального упоминания, поскольку три ферментативных этапа этого пути особенно уязвимы, т.е. подвержены генетическим изменениям, в результате которых возникают три вида врожденных нарушений обмена. У некоторых людей дефект затрагивает первый фермент данного метаболического пути (рис. 19-9) – *фенилаланин—4-монооксигеназу* (ее называют также *фенилаланин-гидроксилазой*), катализирующую гидроксилирование фенилаланина до тирозина. Этот дефект служит причиной заболевания, которое носит название *фенилкетонурии*. Фенилаланин-монооксигеназа катализирует реакцию, в которой один из двух атомов молекулы кислорода O_2 включается в фенилаланин, чтобы образовать гидроксильную группу тирозина; второй атом кислорода восстанавливается при этом до H_2O за счет NADH, который также требуется для этой реакции:

$$\text{L-фенилаланин} + \text{NADH} + H^+ + O_2 \rightarrow \text{L-тирозин} + \text{NAD}^+ + H_2O.$$

При наследственном дефекте, затрагивающем фенилаланин-4-монооксигеназу, на первый план выступает второстепенный путь обмена фенилаланина, в норме мало используемый. На этом второстепенном пути фенилаланин претерпевает трансаминирование в реакции с α-кетоглутаратом, что приводит к образованию *фенилпирувата* (рис. 19-10):

$$\text{Фенилаланин} + \alpha\text{-Кетоглутарат} \rightleftharpoons \text{Фенилпируват} + \text{Глутамат}.$$

Однако дальнейшим превращениям фенилпируват не подвергается, т.е. это тупиковый путь; фенилпируват (а также и фенилаланин) накапливается в крови и тканях, а затем выводится с мочой. Избыток фенилпирувата в крови у новорожденного нарушает нормальное развитие мозга и служит причиной умственной отсталости. Фенилкетонурия (ФКУ) – одно из первых врожденных нарушений обмена, открытых у человека. При достаточно раннем выявлении фенилкетонурии можно с помощью соответствующей диеты создать условия для нормального развития и избежать умственной отсталости. Из рациона должны быть при этом исключены любые продукты, в состав которых входят белки с высоким содержанием фенилаланина. Поскольку почти во всех белках содержится какое-то количество фенилаланина и так как в малых количествах он все же необхо-

$C_6H_5-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ Фенилаланин

+

$^-OOC-CO-CH_2-CH_2-COO^-$ α-Кетоглутарат

⇅ Трансаминаза

$C_6H_5-CH_2-CO-COO^-$ Фенилпируват

+

$^-OOC-CH(NH_3^+)-CH_2-CH_2-COO^-$ Глутамат

Рис. 19-10. Образование фенилпирувата на альтернативном пути, действующем при фенилкетонурии.

дим для нормального роста (это одна из *незаменимых* аминокислот; гл. 26), состав такого рациона должен контролироваться очень тщательно. Природные белки, например казеин молока, следует предварительно подвергать гидролизу и удалять из них фенилаланин.

Выявить фенилкетонурию и назначить ребенку соответствующую диету необходимо в первые же недели после рождения, в противном случае неизбежна необратимая задержка умственного развития. При отсутствии лечения многие больные фенилкетонурией не доживают до 25 лет; других приходится всю жизнь содержать в соответствующих учреждениях и тратить на это много труда и средств (дополнение 19-2). Фенилкетонурия – серьезная проблема здравоохранения. Болезнь эта достаточно широко распространена: на 10000 новорожденных приходится в среднем один с таким дефектом. В США в большей части штатов все новорожденные подвергаются обязательной проверке на фенилкетонурию. Обнаружение этого заболевания не представляет затруднений: требуется только определить содержание фенилаланина и фенилпирувата в моче.

В некоторых случаях в результате генетической мутации дефектным оказывается также четвертый фермент фенилалани-

Дополнение 19-2. Значение некоторых наследственных болезней для человека, общества и экономики

В настоящее время у человека известно по приблизительным подсчетам уже свыше 2000 различных наследственных нарушений или болезней и число их быстро растет. Ежегодно в США рождается более 120000 детей с наследственными заболеваниями. Во многих случаях это тяжкое несчастье отдельных людей, всю глубину которого не всегда можно себе даже представить. Тяжелым бременем ложатся эти болезни и на общество; необходимо, следовательно, позаботиться о том, чтобы будущие родители имели возможность вовремя получить нужные рекомендации и чтобы соответствующие знания шире распространялись в обществе.

Фенилкетонурия может служить примером довольно часто встречающейся генетической болезни, которую легко распознать и которая поддается лечению. Если выявить это патологическое состояние сразу же после рождения ребенка и в течение первых 6 лет его жизни очень строго соблюдать определенную диету, то он вырастет нормальным

человеком. Обнаружение и лечение болезни стоят весьма недешево. Но отказ от них обходится в конечном счете намного дороже, даже если оставить в стороне чисто гуманные соображения. В 1980 г. стоимость теста на ФКУ составляла около двух долларов на одного ребенка. Это означает, что на 3 млн. детей, ежегодно рождающихся в США, необходимо затрачивать около 6 млн. долларов. Поскольку частота положительных тестов на ФКУ равна 1 на 10 000 новорожденных, такое тестирование должно выявлять ежегодно 300 детей, нуждающихся в специальной диете (без фенилаланина). Затраты на подобную диету превышают 1000 долларов в год на одного ребенка. Таким образом, ежегодно на лечебное питание для этих детей (вплоть до 6-летнего возраста) придется выделять 1,8 млн. долларов. В целом по стране стоимость этой программы будет приближаться к 8 млн. долларов в год, и цифра эта, очевидно, будет расти. Эта сумма, которую потребуется ежегодно расходовать всего на 300 детей, может показаться огромной, но мы сейчас увидим, что альтернативный путь связан с гораздо бóльшими затратами. Если у новорожденных не будут проводиться тесты на ФКУ, эти 300 детей будут, вероятно, обречены на то, чтобы провести свою жизнь (в среднем около 30 лет) в специальных учреждениях для умственно отсталых, где общая стоимость содержания одного человека составляет 10 000 долларов в год. Отсюда следует, что, затрачивая на выявление и лечение фенилкетонурии в целом по стране свыше 8 млн. долларов в год, мы в конечном счете сберегаем вдесятеро большую сумму. Таким образом, по крайней мере в отнóшении фенилкетонурии расходы вполне оправдываются. По всей вероятности, так же обстоит дело и с другими наследственными болезнями.

При некоторых генетических заболеваниях проверка будущих родителей позволяет выявить носителей дефектных генов. Такая проверка не гарантирует от ошибок, и в большинстве случаев ее проводят на добровольной основе. Удается, например, выявить носителей серповидноклеточной анемии (разд. 8.17) или болезни Тея–Сакса (гл. 21). К сожалению, для многих других генетических болезней сделать это невозможно. В некоторых случаях метод амниоцентеза позволяет обнаружить ту или иную патологию еще у плода. Так может быть выявлена, в частности, болезнь Тея–Сакса (гл. 21). Правда, для ряда генетических болезней, выявляемых методом амниоцентеза, единственным возможным «лечением» является аборт, а это ставит людей перед трудным выбором.

Всего страшнее те генетические болезни, которые мы не в состоянии предсказать на основе проверки будущих родителей, не можем выявить достаточно рано или пока еще совершенно не умеем лечить. Жертвы таких болезней требуют ухода, затраты на который обычно не под силу частным лицам, так что обществу приходится брать на себя заботу об этих людях. Если бы даже биохимики и могли для каждой генетической болезни указать причину в виде дефектной структуры гена, то все равно одной биологии недостаточно для решения тех социальных и этических проблем, которые порождаются этими болезнями.

нового пути (рис. 19-9) – *гомогентизат—1,2-диоксигеназа*. У людей с таким генетическим дефектом не подвергается дальнейшему расщеплению один из промежуточных продуктов катаболизма фенилаланина – гомогентизат, который на-

капливается в жидкостях тела и выводится из организма с мочой. На воздухе такая моча темнеет. Объясняется это тем, что из-за разложения части мочевины с образованием аммиака pH мочи сдвигается в щелочную сторону; гомогентизат при этом спонтанно окисляется атмосферным O_2 и превращается в темный пигмент, сходный с тем, который содержится в коже людей черной расы. Это врожденное нарушение обмена носит название *алкаптонурии*. У носителей такого дефекта здоровье явным образом ни в чем не страдает, если не считать беспокойства, вызываемого у них самим видом черной мочи. Это тоже немаловажно: известны случаи, когда люди действительно заболевали от одного только страха – черная моча считалась дурным знаком.

В табл. 19-1 указаны и некоторые другие врожденные нарушения аминокислотного обмена.

Таблица 19-1. Некоторые врожденные нарушения аминокислотного обмена у человека

Нарушение	Затронутый фермент
Альбинизм	Тирозин—3-монооксигеназа
Алкаптонурия	Гомогентизат—1,2-диоксигеназа
Аргининосукцинатацидемия	Аргининосукцинат-лиаза
Гомоцистинурия	Цистатионин—β-синтаза
Болезнь кленового сиропа (лейциноз)	Дегидрогеназа α-кетокислот с разветвленной цепью
Фенилкетонурия	Фенилаланин—4-монооксигеназа
Гипервалинемия	Валин-трансаминаза

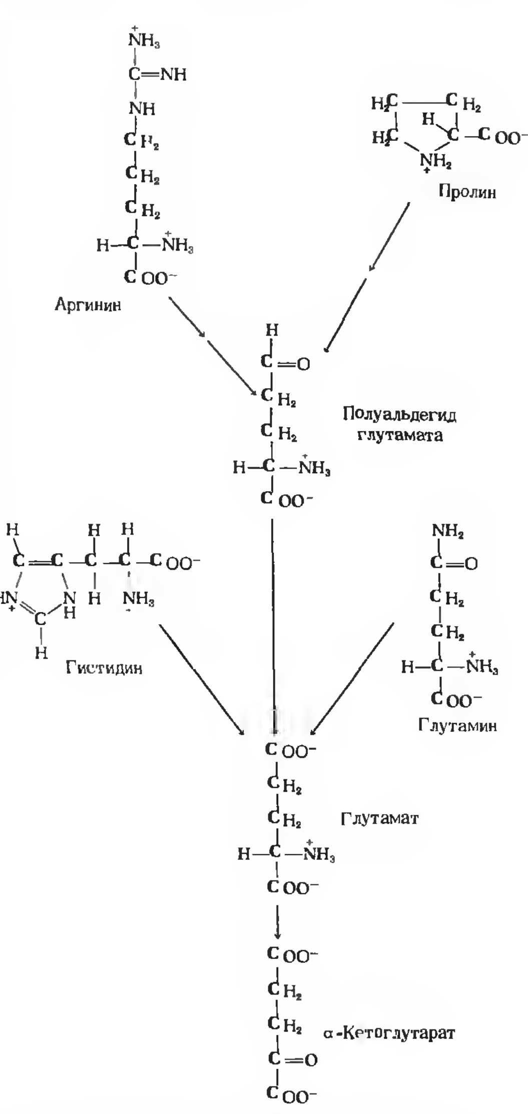


Рис. 19-11. Схема путей, ведущих от аргинина, гистидина, пролина, глутамина и глутамата к α-кетоглутарату.

19.6. Пять аминокислот превращаются в α-кетоглутарат

Углеродные скелеты пяти аминокислот поступают в цикл лимонной кислоты через α-кетоглутарат; к этим аминокислотам относятся *аргинин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин* и *пролин* (рис. 19-11).

19.7. Три аминокислоты превращаются в сукцинил-СоА

Углеродные скелеты *метионина, изолейцина* и *валина* расщепляются в реакциях, приводящих в конечном счете к *сукцинил-СоА*, т. е. к одному из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты (рис. 19-12). Превращения изолейцина и валина протекают сходным

Валин Метионин Изолейцин

Пропионил-CoA

Метилмалонил-CoA

Сукцинил-CoA

Рис. 19-12. Схема путей, ведущих от изолейцина, метионина и валина к сукцинил-CoA.

образом. Обе эти аминокислоты претерпевают трансаминирование с последующим окислительным декарбоксилированием образовавшихся α-кетокислот. В янтарную кислоту включаются четыре из пяти углеродных атомов валина и три из шести углеродных атомов изолейцина.

Окислительное декарбоксилирование трех α-кетокислот, являющихся продуктами дезаминирования валина, изолейцина и лейцина, катализируется одним и тем же ферментным комплексом – *дегидрогеназой α-кетокислот*. У некоторых людей вследствие генетической аномалии этот фермент неактивен, и потому α-кетокислоты накапливаются у них в крови и попадают в мочу, что придает ей специфический запах, из-за которого данную болезнь называют *болезнью кленового сиропа*. Эта довольно редкая аномалия приводит к нарушению нормального развития мозга и при отсутствии лечения – к смерти в раннем возрасте. Лечение сводится к строгой диете, к возможно более полному исключению из рациона трех обычных аминокислот – валина, изолейцина и лейцина. Стоит такое «лечение» чрезвычайно дорого.

19.8. Из фенилаланина и тирозина образуется фумарат

Выше мы отмечали, что из *фенилаланина* и *тирозина* образуется по два четырехуглеродных продукта – *ацетоацетат* и *фумарат* (рис. 19-9). Ацетоацетат поступает в цикл лимонной кислоты в форме ацетил-CoA, а фумарат сам является промежуточным продуктом этого цикла.

19.9. Оксалоацетатный путь

Углеродные скелеты аспарагина и аспарагиновой кислоты поступают в конечном счете в цикл лимонной кислоты через оксалоацетат (рис. 19-4). Фермент *аспарагиназа* катализирует гидролиз аспарагина с образованием аспартата

$$\text{Аспарагин} + H_2O \rightarrow \text{Аспартат}^- + NH_4^+.$$

Аминогруппа аспартата передается затем α-кетоглутарату в реакции трансаминирования, продуктом которой является глутамат

$$\text{Аспартат} + \alpha\text{-Кетоглутарат} \rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + \text{Глутамат}.$$

Остающийся углеродный скелет аспартата, в форме оксалоацетата, включается в цикл лимонной кислоты.

Итак, мы познакомились теперь с тем, каким образом 20 различных аминокислот расщепляются – после дезаминирования – в результате дегидрирования, декарбоксилирования и других превращений до пяти известных метаболитов, в виде которых фрагменты их углеродных скелетов могут включаться

в цикл лимонной кислоты. Здесь эти фрагменты окисляются уже полностью – до двуокиси углерода и воды. Во время переноса электронов в процессе окислительного фосфорилирования синтезируется ATP. Таким путем аминокислоты вносят свой вклад в общее обеспечение организма энергией.

19.10. Некоторые аминокислоты могут превращаться в глюкозу, а другие – в кетоновые тела

Мы уже знаем, что пять аминокислот, распадаясь, превращаются в конце концов в ацетоацетил-СоА. В печени из этих аминокислот могут образовываться кетоновые тела, потому что ацетоацетил-СоА способен превращаться в ацетоацетат и β-гидроксибутират (разд. 18.10). Пять аминокислот, о которых идет речь, носят поэтому название *кетогенных* (табл. 19-2). Их способность образовывать кетоновые тела проявляется особенно отчетливо в случае нелеченого сахарного диабета; в печени при этом вырабатываются большие количества кетоновых тел, источником которых служат помимо жирных кислот еще и кетогенные аминокислоты.

Таблица 19-2. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты

Глюкогенные	Пролин
Аланин	Серин
Аргинин	Треонин
Аспарагин	Триптофан
Аспарагиновая кислота	Цистеин
Валин	*Кетогенные*
Глутаминовая кислота	Лейцин
Глутамин	Лизин
Глицин	Триптофан
Гистидин	*Кетогенные и глюкогенные*
Метионин	Тирозин
	Фенилаланин

Пятнадцать аминокислот, распадающихся с образованием α-кетоглутарата, сукцината и оксалоацетата, могут превращаться в глюкозу и гликоген по пути, описанному в гл. 20. Их называют *глюкогенными* аминокислотами (табл. 19.2). Между кетогенными и глюкогенными аминокислотами нет четкой границы, поскольку две аминокислоты (фенилаланин и тирозин) принадлежат одновременно и к той, и к другой группе. Некоторые из аминокислот, превращающихся в пируват, в частности аланин, цистеин и серин, также потенциально способны образовывать ацетоацетат через ацетил-СоА, особенно у больных сахарным диабетом (разд. 18.10, 19.3).

19.11. Аммиак для животных токсичен

Выше мы прервали начатое обсуждение обмена аминогрупп, чтобы рассмотреть процесс расщепления дезаминированных аминокислот, служащих источником энергии. Вернемся теперь к тому, на чем мы остановились ранее, и займемся судьбой аммиака, образующегося в результате окислительного дезаминирования глутамата под действием глутаматдегидрогеназы, т.е. в результате процесса, протекающего практически во всех тканях. Здесь мы сталкиваемся с серьезной биохимической проблемой, потому что аммиак – крайне токсичное вещество, особо опасное для мозга. Аммиак настолько токсичен, что инъекция животному даже самого слабого его раствора может вызвать кому.

Причина столь резкого действия аммиака на мозг пока не вполне ясна. Объяснение можно, очевидно, искать в двух главных факторах. 1) Аммиак характеризуется очень высоким значением *pK'*, поэтому при pH крови он существует почти целиком в виде иона аммония (NH_4^+). Ионы NH_4^+ проникают через плазматическую и митохондриальную мембраны с большим трудом. В отличие от них нейтральные молекулы свободного аммиака (NH_3) легко проходят через эти мембраны. И хотя в крови при pH 7,4 доля свободного аммиака составляет всего лишь около 1% от общего его количества, этот свободный аммиак проходит сквозь мембраны и проникает в клетки мозга, а также в их митохондрии. 2) Попав в митохондрии клеток мозга, аммиак

взаимодействует здесь с α-кетоглутаратом, образуя глутамат; эта реакция представляет собой обращение глутаматдегидрогеназной реакции:

$$NH_4^+ + \alpha\text{-Кетоглутарат}^{2-} + NADPH + H^+ \rightarrow \text{Глутамат}^- + NADP^+ + H_2O.$$

Результатом ее является в конечном счете отток α-кетоглутарата из пула промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты в митохондриях мозга и как следствие этого – снижение скорости окисления глюкозы, играющей роль главного топлива для клеток мозга. Оба названных фактора, несомненно, очень важны, но есть, очевидно, и какие-то другие причины высокой чувствительности мозга к аммиаку, пока еще недостаточно изученные.

19.12. Аммиак переносится в печень из многих периферических тканей в виде глутамина

Попробуем теперь ответить на следующий вопрос: каким образом токсичный аммиак попадает из периферических тканей в те органы, которые его обезвреживают или выводят из организма, и мозг при этом не подвергается опасности?

У большинства животных аммиак превращается сначала в нетоксичное соединение и лишь в таком виде переносится кровью от периферических тканей к печени или почкам. Во многих тканях, включая и мозг, аммиак взаимодействует с глутаматом в ферментативной реакции, катализируемой *глутаминсинтетазой*, в результате чего образуется *глутамин*

$$ATP + NH_4^+ + \text{Глутамат} \rightarrow ADP + P_i + \text{Глутамин} + H^+.$$

Эта реакция протекает через стадию образования высокоэнергетического промежуточного продукта, связанного с ферментом (рис. 19-13). Роль такого промежуточного продукта играет *глутамил-5-фосфат* – ацилфосфат, образующийся в результате фосфорилирования глутамата (за счет ATP) по карбоксильной группе в 5-м положении. Связанный с ферментом глутамил-5-фосфат соединяется с аммиаком в активном центре глутаминсинтетазы; при этом образуется глутамин и высвобождается фосфат. Глутамин представляет собой нейтральное нетоксичное соединение, способное легко проходить через клеточные мембраны; этим он отличается от глутамата, который не обладает такой способностью, потому что его молекулы несут суммарный отрицательный заряд (рис. 5-6).

Рис. 19-13. Образование глутамил-5-фосфата в качестве связанного с ферментом промежуточного продукта при глутаминсинтетазной реакции.

У большинства наземных животных глутамин доставляется кровью в печень. Здесь он под действием фермента *глутаминазы* превращается в глутамат и аммиак

$$\text{Глутамин} + H_2O \rightarrow \text{Глутамат}^- + NH_4^+.$$

В печени происходит затем превращение образовавшегося аммиака в мочевину. Глутамин – это та форма, в которой главным образом и транспортируется аммиак; в крови здоровых людей его содержание существенно превышает содержание других аминокислот.

19.13. Аммиак переносится из мышц в печень в виде аланина

Особую роль в переносе аммиака в печень в нетоксичной форме играет также аланин. В мышцах, как и в прочих тканях, аммиак образуется при расщеплении аминокислот. Кроме того, в скелетных мышцах при напряженной работе важное значение приобретает и такой процесс, как дезаминирование аденилата (AMP), тоже являющегося источником аммиака. Поступающий из этих двух источников аммиак переносится из мышц в печень в виде аминокислоты аланина через *глюкозо-аланиновый цикл* (рис. 19-14). В этом цикле аммиак превращается в аминогруппу глутамата в реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой

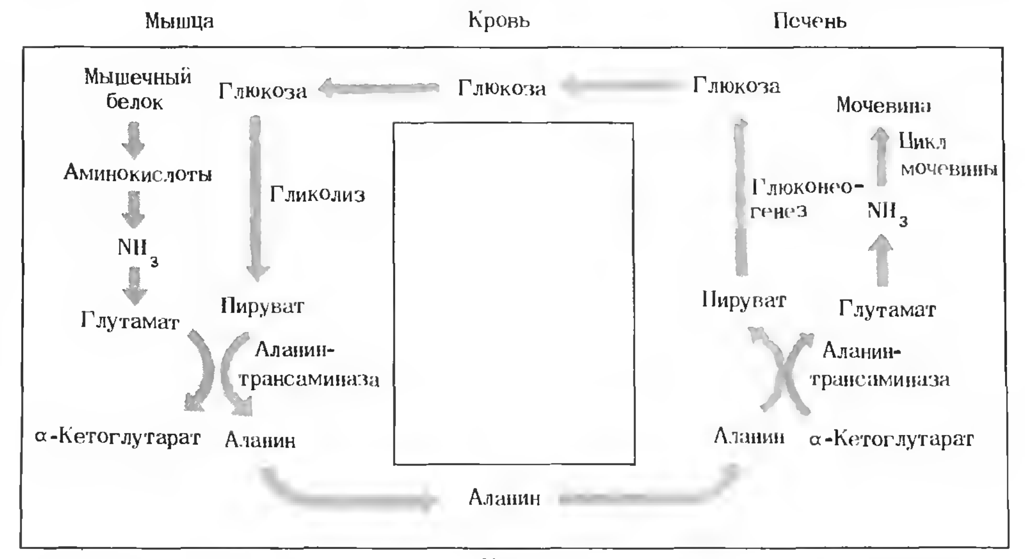
$$NH_4^+ + \alpha\text{-Кетоглутарат}^{2-} + NADPH + H^+ \rightarrow \text{Глутамат}^- + NADP^+ + H_2O.$$

Образовавшийся глутамат переносит затем свою α-аминогруппу на пируват, всегда имеющийся в достаточном количестве, поскольку это продукт протекающего в мышцах гликолиза. Реакция переноса катализируется *аланин-трансаминазой*

$$\text{Глутамат} + \text{Пируват} \rightleftarrows \alpha\text{-Кетоглутарат} + \text{Аланин}.$$

Аланин (нейтральная аминокислота, не несущая суммарного заряда при значениях pH, близких к 7) выходит из клеток

Рис. 19-14. Глюкозо-аланиновый цикл. Этот цикл выполняет две функции: 1) переносит аминогруппы из скелетных мышц в печень, где они превращаются в мочевину, и 2) обеспечивает работающие мышцы глюкозой, поступающей с кровью из печени, где для ее образования используется углеродный скелет аланина.



в кровь и доставляется кровью к печени. Здесь он под действием аланин-трансаминазы передает свою аминогруппу α-кетоглутарату, в результате чего образуется глутамат. Далее этот глутамат в реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой, дезаминируется с образованием α-кетоглутарата и аммиака, который в печени превращается в мочевину.

Выбор такого соединения, как аланин, для переноса аммиака из напряженно работающих скелетных мышц в печень – это еще один наглядный пример принципа экономии, действующего в живых организмах. При тяжелой работе в сокращающихся скелетных мышцах образуется не только аммиак, но еще и большие количества пирувата, представляющего собой продукт гликолиза. Оба этих продукта должны быть доставлены в печень, где аммиак превратится в мочевину и в такой форме будет выведен из организма, а из пирувата ресинтезируется глюкоза, которая через кровь будет возвращена в мышцы. Животные нашли путь, в котором один цикл решает обе проблемы: в этом цикле аммиак, соединяясь с пируватом, образует аланин – нетоксичную нейтральную аминокислоту, которая через кровь направляется в печень и уже здесь подвергается дальнейшим превращениям (рис. 19-14).

19.14. Выведение аминного азота из организма составляет еще одну сложную биохимическую проблему

Каким образом выводится из организма избыток аминного азота? Сравнительные биохимические исследования на разных видах животных показали, что существуют три главные формы, в которых может выводиться из организма аминный азот – свободный *аммиак*, *мочевина* и *мочевая кислота*. Большинство животных, обитающих в воде, например костные рыбы, выделяют аминный азот в виде аммиака; такие организмы называются *аммониотелическими*. У большинства наземных животных аминный азот выводится в виде мочевины; их называют *уреотелическими*. У птиц, ящериц и змей он выводится в виде мочевой кислоты; такие организмы носят название *урикотелических* (рис. 19-15).

NH_3
Аммиак

Аммониотелические животные:
большинство водных позвоночных, главным образом костные рыбы и личинки амфибий

$H_2N—C(=O)—NH_2$
Мочевина

Уреотелические животные:
большинство наземных позвоночных, а также акулы

[структурная формула мочевой кислоты]
Мочевая кислота

Урикотелические животные:
птицы, змеи, ящерицы

Рис. 19-15. Различные формы аминного азота, в которых он выводится из организма у разных видов животных.

Эти различия обусловлены анатомическими и физиологическими различиями указанных групп животных, связанными со средой их обитания. У костных рыб аминный азот транспортируется кровью в виде глутамина, но через жабры он выводится в виде аммиака, потому что в жабрах содержится глутаминаза, катализирующая гидролиз глутамина, приводящий к образованию глутамата и аммиака. Поскольку аммиак легко растворим в воде, он быстро разбавляется и уносится током воды, в большом количестве омывающей жабры. Костным рыбам, следовательно, не требуется сложной мочевой системы для выделения аммиака.

Однако, когда в процессе эволюции некоторые водные животные начали приспосабливаться к наземному образу жизни, выделение аминного азота в виде аммиака через жабры стало для них уже невозможным. Со временем у наземных животных возникли другие способы выделения аминного азота. Таким жи-

вотным для выведения из организма водорастворимых продуктов азотистого обмена требуются почки и мочевой пузырь. Ясно, однако, что выделение прямо в мочу больших количеств свободного NH_3, легко проникающего сквозь мембраны, могло бы приводить к его реабсорбции, т. е. к его возвращению в кровь. Есть в этом и еще одно неудобство: поскольку аммиак находится в крови главным образом в виде иона NH_4^+, его выведение потребовало бы одновременного выведения такого же количества каких-нибудь анионов, например хлорид-иона или фосфат-иона. Чтобы избежать этих осложняющих обстоятельств, большинство наземных животных приобрело в процессе эволюции способность выделять аминный азот в виде мочевины – нейтрального хорошо растворимого в воде и нетоксичного соединения. Однако такая способность образовывать и выделять мочевину не дается даром: как мы увидим далее, для этого организму приходится затрачивать значительные количества энергии в форме ATP.

Для птиц очень важен их вес. Между тем вместе с мочевиной в мочу должны поступать и довольно большие количества воды. Поэтому у птиц в процессе эволюции выработался другой способ выведения аминного азота, в котором вода в заметных количествах не участвует. У них аминный азот превращается в мочевую кислоту, которая относительно плохо растворима в воде, так что моча птиц представляет собой полутвердую массу, состоящую из кристаллов мочевой кислоты и очень небольшого количества воды (рис. 19-15). Преимущество, которое дает выведение аминного азота в виде твердой мочевой кислоты, организм птиц оплачивает усиленной метаболической работой, потому что биосинтез мочевой кислоты – это сложный процесс, требующий затраты энергии.

Проиллюстрировать важную роль среды обитания в определении способа выведения из организма аминного азота можно на примере головастиков, у которых в процессе метаморфоза этот способ меняется. Головастики, обитающие только в воде, выделяют аминный азот в виде аммиака через жабры. В печени у головастика нет ферментов, необходимых для того, чтобы вырабатывать мочевину, однако в процессе метаморфоза эти ферменты у него появляются и он утрачивает способность выделять аммиак. У взрослой лягушки, которая бóльшую часть времени проводит на суше, аминный азот почти целиком выделяется в виде мочевины.

19.15. В выделении аммиака участвует глутаминаза

У аммониотелических животных аминогруппы от различных аминокислот передаются в реакциях трансаминирования на α-кетоглутарат, что приводит к образованию глутамата. В митохондриях печени при участии глутаматдегидрогеназы происходит окислительное дезаминирование этого глутамата с образованием свободного аммиака. Будучи крайне токсичным, свободный аммиак не может транспортироваться кровью; он включается в виде амидной группы в глутамин, образующийся под действием *глутаминсинтетазы*. Нетоксичный нейтральный глутамин затем переносится кровью в жабры. Здесь он теряет свой амидный азот, который отщепляется в виде иона аммония (NH_4^+) в реакции, катализируемой *глутаминазой*

$$\text{Глутамин} + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Глутамат}^- + NH_4^+.$$

19.16. Мочевина образуется в цикле мочевины

В организме уреотелических животных аммиак, образующийся при дезаминировании аминокислот, превращается в печени в мочевину. Это превращение совершается в форме цикла, который был назван *циклом мочевины*. Его открыли Ганс Кребс (разд. 16.4) и Курт Хенселайт в 1932 г. Кребсу, таким образом, принадлежит честь открытия двух важнейших метаболических циклов. Цикл мочевины был открыт первым в процессе исследований, которые Кребс проводил, работая

$$\underset{\text{Орнитин}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3\overset{+}{N}-C-H \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ \overset{+}{N}H_3 \end{array}} \xrightarrow{HCO_3^- + NH_4^+ \;\to\; H_2O + 2H^+} \underset{\text{Цитруллин}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3\overset{+}{N}-C-H \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH \\ | \\ C=O \\ | \\ NH_2 \end{array}} \xrightarrow{NH_4^+ \;\to\; H_2O} \underset{\text{Аргинин}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3\overset{+}{N}-C-H \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ NH \\ | \\ C=\overset{+}{N}H_2 \\ | \\ NH_2 \end{array}}$$

Рис. 19-16. Три аминокислоты, способные, как установил Кребс, стимулировать превращение аммиака в мочевину в срезах печени. Орнитин и цитруллин можно, очевидно, считать предшественниками аргинина. Группы, образовавшиеся из аммиака, выделены красным.

в одной из больниц Фрейбурга в Германии. Вместе со студентом-медиком Хенселайтом он изучал превращение аммиака в мочевину в тонких срезах печени, суспендированных в забуферной аэробной среде. Они обнаружили, что скорость образования мочевины резко возрастает, если добавить к среде *орнитин*, *цитруллин* или *аргинин* (рис. 19-16). Аргинин – это одна из обычных аминокислот, содержащихся в белках. Что же касается орнитина и цитруллина, то, хотя это тоже α-аминокислоты, они не принадлежат к строительным блокам белков. Все три названных соединения стимулировали образование мочевины гораздо сильнее, чем какое бы то ни было другое из обычных азотистых соединений, которые тоже были испытаны. Рассмотрение структур этих трех активных соединений навело на мысль, что они, возможно, связаны в некой последовательности, в которой орнитин является предшественником цитруллина, а цитруллин в свою очередь – предшественником аргинина (рис. 19-16). Задолго до этого было уже известно, что аргинин может гидролизоваться с образованием орнитина и мочевины под действием фермента *аргиназы*

$$\text{Аргинин} + H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{Орнитин} + \text{Мочевина}.$$

Из этих данных Кребс сделал вывод, что здесь протекает какой-то циклический процесс, а орнитин играет в нем роль, подобную той, какую (как позже стало известно) оксалоацетат играет в цикле лимонной кислоты. Молекула орнитина присоединяет по одной молекуле NH_3 и CO_2, в результате чего образуется цитруллин. Вторая молекула аммиака присоединяется к цитруллину, который при этом превращается в аргинин. Последующий гидролиз аргинина приводит к образованию мочевины с одновременной регенерацией молекулы орнитина (рис. 19-17). Реакции, завершающиеся образованием аргинина, свойственны всем организмам, способным синтезировать аргинин, но только уреотелические животные обладают достаточным количеством аргиназы, катализирующей необратимую реакцию гидролиза аргинина, в ходе которой образуется мочевина и регенерирует орнитин. Этот регенерировавший орнитин может использоваться для нового оборота цикла. Мочевина – продукт цикла – пред-

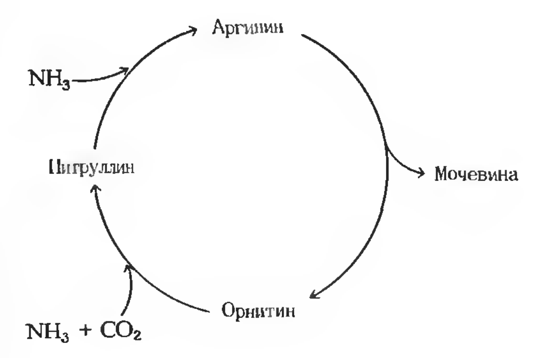


Рис. 19-17. Цикл мочевины в том виде, как его постулировали Кребс и Хенселайт.

ставляет собой нейтральное нетоксичное водорастворимое соединение. Она доставляется кровью в почки и выводится с мочой.

19.17. Цикл мочевины включает ряд сложных стадий

Познакомимся теперь с современными представлениями о последовательных стадиях цикла мочевины (рис. 19-18). Первая аминогруппа, поступающая в этот цикл, получается в виде свободного аммиака при окислительном дезаминировании глутамата в митохондриях клеток печени; эта реакция катализируется *глутаматдегидрогеназой*, для действия которой требуется NAD^+

$$\text{Глутамат}^- + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \alpha\text{-Кетоглутарат}^{2-} + NH_4^+ +$$

$$+ NADH + H^+.$$

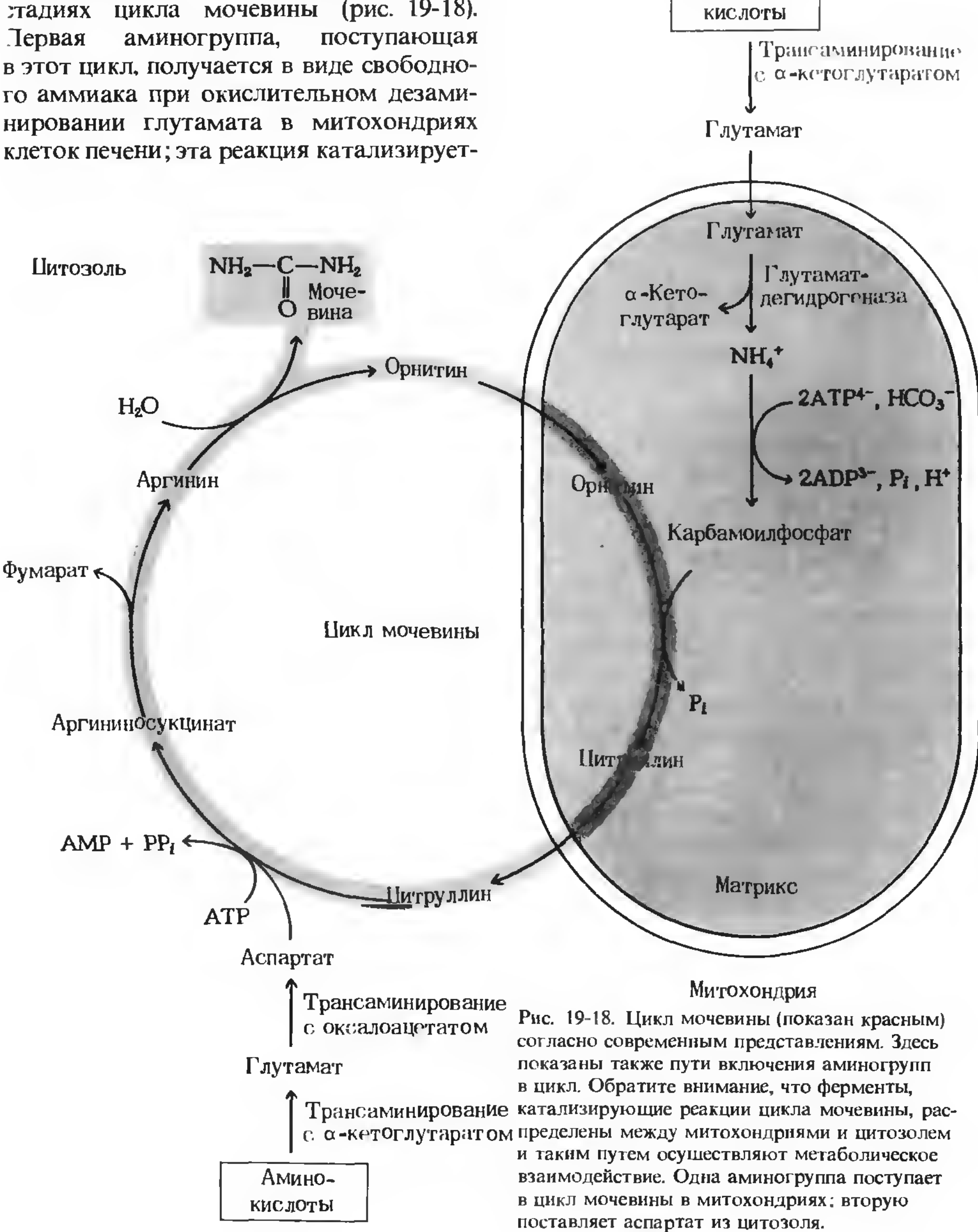


Рис. 19-18. Цикл мочевины (показан красным) согласно современным представлениям. Здесь показаны также пути включения аминогрупп в цикл. Обратите внимание, что ферменты, катализирующие реакции цикла мочевины, распределены между митохондриями и цитозолем и таким путем осуществляют метаболическое взаимодействие. Одна аминогруппа поступает в цикл мочевины в митохондриях; вторую поставляет аспартат из цитозоля.

Образовавшийся свободный аммиак вместе с двуокисью углерода, источником которой служит в митохондриях процесс дыхания, немедленно же используется для образования *карбамоилфосфата* в АТР-зависимой реакции, протекающей в митохондриальном матриксе. Эту реакцию катализирует фермент, называемый *карбамоилфосфат-синтетазой I*. Римская цифра I добавлена к его названию для того, чтобы отличать эту митохондриальную форму фермента от его цитозольной формы – карбамоилфосфат-синтетазы II. У этой последней другая функция – она участвует в биосинтезе нуклеотидов (гл. 22). Реакция, протекающая в митохондриях, описывается уравнением

$$HCO_3^- + NH_4^+ + 2ATP^{4-} \longrightarrow H_2N{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}O{-}PO_3^{2-} + 2ADP^{3-} + P_i^- + H^+$$

Карбамоилфосфат

$\Delta G^{\circ\prime} = -3.3$ ккал/моль

Карбамоилфосфат-синтетаза I представляет собой регуляторный фермент; положительным, или активирующим, модулятором служит для нее N-ацетилглутамат. Карбамоилфосфат (рис. 19-19) принадлежит к высокоэнергетическим соединениям; его можно считать активированным донором карбамоильных групп. Отметим, что при образовании одной молекулы карбамоилфосфата используются концевые фосфатные группы двух молекул АТР.

На следующей стадии цикла мочевины карбамоилфосфат передает свою карбамоильную группу на орнитин, что приводит к образованию цитруллина и высвобождению фосфата (рис. 19-20). Эта реакция катализируется Mg^{2+}-зависимым митохондриальным ферментом, который носит название *орнитин-транскарбамоилазы*

$$H_2N{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}O{-}\overset{\overset{O^-}{|}}{\underset{\underset{O}{\|}}{P}}{-}O^-$$

Рис. 19-19. Карбамоилфосфат. Он представляет собой ацилфосфат – смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот. Вследствие этого он является высокоэнергетическим соединением. Карбамоильная группа выделена красным.

Орнитин: COO^- — $H_3\overset{+}{N}{-}C{-}H$ — CH_2 — CH_2 — CH_2 — $\overset{+}{N}H_3$

+

Карбамоилфосфат: $NH_2{-}C(=O){-}O{-}P(=O)(O^-){-}O^-$

$\downarrow$ Орнитин-транскарбамоилаза ($\longrightarrow P_i$)

Цитруллин: COO^- — $H_3\overset{+}{N}{-}C{-}H$ — CH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — $C{=}O$ — NH_2

+

H^+

Рис. 19-20. Образование цитруллина из орнитина из карбамоилфосфата. Включившаяся карбамоильная группа выделена красным.

$$\text{Карбамоилфосфат} + \text{Орнитин} \rightarrow \rightarrow \text{Цитруллин} + P_i^- + H^+.$$

Образовавшийся цитруллин переходит из митохондрий в цитозоль клеток печени.

Теперь в цикл вводится вторая аминогруппа в форме L-аспартата, который образуется в результате трансаминиро-

вания из L-глутамата под действием *аспартат-трансаминазы*

Оксалоацетат + L-глутамат ⇌

⇌ L-аспартат + α-Кетоглутарат.

L-глутамат может, разумеется, получить свою аминогруппу почти от любой из других обычных аминокислот в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом. Перенос второй аминогруппы на цитруллин происходит в результате реакции конденсации между аминогруппой аспартата и карбонильными углеродом цитруллина в присутствии ATP; при этом образуется *аргининосукцинат* (рис. 19-21). Реакция катализируется *аргининосукцинат-синтетазой* (Mg^{2+}-зависимым ферментом, содержащимся в цитозоле клеток печени)

Цитруллин + Аспартат + ATP →

→ Аргининосукцинат + AMP +

+ PP_i + H^+.

На следующей стадии аргининосукцинат под действием *аргининосукцинат-лиазы* (рис. 19-22) обратимо расщепляется с образованием аргинина и фумарата

Аргининосукцинат ⇌ Аргинин +

+ Фумарат

Образовавшийся фумарат возвращается в пул промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты. Следовательно, эта реакция представляет собой звено, связывающее цикл мочевины с циклом лимонной кислоты (поэтому оба эти цикла вместе называют иногда бициклом Кребса).

Последнюю стадию цикла мочевины составляет расщепление аргинина под действием аргиназы, содержащейся в печени; продуктами этой реакции являются мочевина и орнитин (рис. 19-23)

Аргинин + H_2O →

→ Орнитин + Мочевина.

Таким образом, регенерированный орнитин может снова поступать в митохон-

Рис. 19-21. Образование аргининосукцината. Карбамоильная группа цитруллина и аминогруппа, поставляемая аспартатом, выделены красным. Остальная часть молекулы аспартата показана на сером фоне.

дрии и запускать здесь новый оборот цикла мочевины.

Суммарное уравнение цикла мочевины имеет вид

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP^{4-} +$$

$$+ H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{Мочевина} + 2ADP^{3-} + 2P_i^- + AMP^- + PP_i^{3-} + H^+.$$

В цикле мочевины две аминогруппы и ион HCO_3^-, соединяясь, образуют молекулу мочевины, которая диффундирует из клеток печени в кровь и через почки выводится из организма с мочой. Таким образом, в организме уреотелических животных токсичный аммиак превращается в безвредную мочевину.

Аргининосукцинат: COO^- — $H_3\overset{+}{N}$—C—H — CH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — C=$\overset{+}{N}H_2$ — NH — H—C—COO^- — CH_2 — COO^-

↓ Аргининосукцинат-лиаза

Аргинин: COO^- — $H_3\overset{+}{N}$—C—H — CH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — C=$\overset{+}{N}H_2$ — NH_2

\+

Фумарат: COO^- — HC = CH — COO^-

Рис. 19-22. Образование аргинина из аргининосукцината.

Аргинин: COO^- — $H_3\overset{+}{N}$—C—H — CH_2 — CH_2 — CH_2 — NH — C=$\overset{+}{N}H_2$ — NH_2

H_2O ↓ Аргиназа

Орнитин: COO^- — $H_3\overset{+}{N}$—C—H — CH_2 — CH_2 — CH_2 — $\overset{+}{N}H_3$

\+

Мочевина: NH_2 — C=O — NH_2

Рис. 19-23. Образование мочевины в реакции, катализируемой аргиназой.

Отметим, что на каждую образующуюся молекулу мочевины потребляется один ион HCO_3^-. Цикл мочевины позволяет, следовательно, организму избавляться от двух продуктов, представляющих собой отходы метаболизма,– от аммиака и бикарбоната. Этот факт дает также основания считать, что цикл мочевины принимает участие в регулировании pH крови, поскольку величина pH крови определяется соотношением растворенной CO_2 и HCO_3^- (разд. 4.11).

19.18. Энергетическая цена синтеза мочевины

Из проведенного выше уравнения следует, что на синтез одной молекулы мочевины расходуются четыре высокоэнер-

гетические фосфатные группы. Две молекулы АТР требуются для образования карбамоилфосфата и одна – для образования аргининосукцината. Однако в последней реакции АТР претерпевает пирофосфатное расщепление (разд. 14.17), продуктами которого являются AMP и пирофосфат, гидролизующийся затем с образованием двух молекул ортофосфата. Поэтому в общей сложности на образование одной молекулы мочевины расходуются четыре молекулы АТР.

Выделяя вместо аммиака мочевину, уреотелические животные оплачивают это свое преимущество, теряя, согласно оценке, около 15% энергии тех аминокислот, которые служат источником этой мочевины. У некоторых жвачных животных эти потери энергии в той или иной мере возмещаются. Так, у коровы, например, значительная часть мочевины поступает из крови в первый отдел желудка (рубец). Обитающие здесь бактерии используют ее в качестве источника NH_3 для синтеза аминокислот, которые затем всасываются и утилизируются организмом хозяина. У верблюда мочевина поступает в желудочно-кишечный тракт и возвращается в цикл тем же способом, что избавляет животное от потерь воды, неизбежных при выделении мочевины с мочой. Это одно из тех биохимических и физиологических приспособлений, которые дают возможность верблюду обходиться очень малым количеством воды. Ни жвачные, ни какие-либо другие группы животных не способны сами по себе, без помощи микроорганизмов, использовать мочевину в качестве источника аминогрупп для синтеза аминокислот. Причина этого в том, что у них отсутствуют ферменты, необходимые для того, чтобы гидролизовать или использовать мочевину.

19.19. Генетические дефекты, затрагивающие цикл мочевины, вызывают накопление аммиака в крови

При наследуемых генетических дефектах, затрагивающих тот или иной фермент в цикле мочевины, организм оказывается лишенным способности синтезировать мочевину из аммиака. Люди с такими дефектами не переносят пищи, богатой белком. Если количество потребляемых ими аминокислот превышает минимальную суточную потребность, связанную с синтезом белка, то у них в крови появляется свободный аммиак, образующийся при дезаминировании избытка аминокислот в печени. Как мы уже знаем, аммиак чрезвычайно токсичен. Он вызывает психические расстройства, задержку умственного развития, а при высоких концентрациях – кому и смерть. Детей с таким нарушением часто лечат тем, что вместо необходимых для роста аминокислот (гл. 26) в их рацион вводят α-кетоаналоги этих аминокислот. Как известно, в молекулах незаменимых аминокислот важны их углеродные скелеты, а не аминогруппы. α-Кетоаналоги незаменимых аминокислот могут под действием трансаминаз присоединять аминогруппы от имеющихся в избытке заменимых аминокислот (рис. 19–24). Это предотвращает возможность попа-

$$\mathrm{COO^-{-}C({=}O){-}R_E} \; + \; \mathrm{{}^+H_3N{-}CH(COO^-){-}R_N}\ \text{(Заменимые аминокислоты)}$$

$$\rightleftharpoons$$

$$\mathrm{COO^-{-}C({=}O){-}R_N} \; + \; \mathrm{{}^+H_3N{-}CH(COO^-){-}R_E}\ \text{(Незаменимые аминокислоты)}$$

Рис. 19-24. Аминирование α-кетоаналогов незаменимых аминокислот (индекс E) в реакциях трансаминирования с заменимыми аминокислотами (индекс N).

дания этих аминогрупп в кровь в виде аммиака.

19.20. У птиц, змей и ящериц из организма выводится мочевая кислота

Урикотелические животные (птицы, змеи и ящерицы) выделяют аминный азот главным образом в виде мочевой кислоты (рис. 19-25). Мочевая кислота является также главным конечным продуктом обмена пуринов у приматов, птиц и рептилий. Молекула мочевой кислоты имеет довольно сложное строение: она состоит из двух конденсированных колец, составляющих так называемое *пуриновое ядро*. К пуринам относятся также аденин и гуанин, входящие в состав соответствующих нуклеотидов. Синтез мочевой кислоты из аминогрупп представляет собой многоэтапный процесс, потому что пуриновое ядро строится постепенно из ряда простых предшественников. На рис. 19-25 указано происхождение углеродных и азотных атомов мочевой кислоты, установленное на основе опытов с использованием предшественников, меченных изотопами. Сложный путь синтеза пуринов и мочевой кислоты мы рассмотрим в гл. 22. Здесь же достаточно отметить, что этот процесс включает много этапов и требует значительных затрат энергии. Таким образом, урикотелические животные вынуждены платить весьма солидную цену за то преимущество, которое они получают от выведения аминного азота в полутвердой форме. Отчасти это, правда, компенсируется тем, что в виде мочевой кислоты выводится не только аминный азот; она представляет собой также и конечный продукт катаболизма пуринов (гл. 22).

У побережья Южной Америки на многих островах, которые служат местом гигантских птичьих базаров, имеются огромные запасы мочевой кислоты (рис. 19-26). Эти богатейшие залежи гуано разрабатываются; гуано применяется как удобрение. Таким путем органический азот возвращается в почву и может вновь использоваться для синтеза амино-



Рис. 19-26. Остров Сан-Лоренцо близ побережья Перу – один из тех островов, на которых имеются залежи гуано. На этих островах гнездятся сотни тысяч птиц, так что за многие века здесь скопились целые горы гуано, состоящего в основном из твердой мочевой кислоты. Гуано – ценное удобрение; одна тонна его стоит больше 100 долларов. Во второй половине прошлого века целые флотилии парусных судов развозили гуано по всему миру, ведя торговлю со многими странами.

Рис. 19-25. Выделение аминного азота в виде мочевой кислоты у птиц, змей и ящериц. Атомы азота мочевой кислоты (показаны красным) происходят от α-аминогрупп аминокислот; в молекулу мочевой кислоты они включаются очень сложным путем. Мочевую кислоту называют кислотой, потому что она существует в таутомерных формах, способных ионизироваться и образовывать ураты. Ураты Na^+ и K^+ лишь немного лучше растворимы в воде, чем сама мочевая кислота.

Лактамная форма ⇌ Лактимная форма ⇌ Полностью ионизированный урат

кислот растениями и почвенными микроорганизмами.

Краткое содержание главы

Небольшая часть окислительной энергии, вырабатываемой в организме человека, имеет своим источником окислительный катаболизм аминокислот. После удаления аминогрупп в реакциях трансаминирования с α-кетоглутаратом углеродные скелеты аминокислот подвергаются окислительному расщеплению и превращаются в соединения, способные включаться в цикл лимонной кислоты и окисляться в нем до CO_2 и H_2O. Есть пять путей, по которым углеродные скелеты аминокислот могут поступать в цикл лимонной кислоты: 1) через ацетил-СоА, 2) через α-кетоглутарат, 3) через сукцинат, 4) через фумарат и 5) через оксалоацетат. Аминокислоты, включающиеся в цикл лимонной кислоты через ацетил-СоА, подразделяются на две группы: аминокислоты первой группы (аланин, цистеин, глицин, серин и треонин) превращаются в ацетил-СоА через пируват, а аминокислоты второй группы (лейцин, лизин, фенилаланин, тирозин и триптофан) – через ацетоацетил-СоА. Углеродные скелеты пролина, гистидина, аргинина, глутамина и глутаминовой кислоты поступают в цикл лимонной кислоты через α-кетоглутарат; метионин, изолейцин и валин – через сукцинат; четыре углеродных атома фенилаланина и тирозина – через фумарат, и, наконец, аспарагин и аспарагиновая кислота – через оксалоацетат. У человека известен ряд врожденных нарушений аминокислотного обмена. Особенно серьезным и довольно широко распространенным нарушением такого типа является фенилкетонурия.

У аммониотелических животных (костных рыб, головастиков) аминный азот выводится через жабры в виде аммиака, который образуется в результате гидролиза глутамина. Уреотелические животные (к этой группе относится большинство наземных животных) выделяют аминный азот в виде мочевины. Мочевина образуется в печени; этот процесс, открытый Гансом Кребсом, получил название цикла мочевины. Непосредственным предшественником мочевины служит аргинин: под действием аргиназы он гидролизуется с образованием мочевины и орнитина. Из орнитина затем вновь синтезируется аргинин; для этого орнитин сначала карбамоилируется за счет карбамоилфосфата с образованием цитруллина, а затем к цитруллину присоединяется аминогруппа, поступающая от аспартата. Орнитин регенерирует в каждом обороте цикла мочевины. Урикотелические животные (птицы, змеи и ящерицы) выделяют аминный азот в полутвердой форме в виде мочевой кислоты, которая представляет собой производное пурина. Выведение аминного азота в виде нетоксичного соединения (мочевины) или в виде твердого вещества (мочевой кислоты) требует от организма значительной затраты энергии АТР.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Baldwin E. An Introduction to Comparative Biochemistry, 4th ed., Cambridge University Press, New York, 1964.

Cunningham E. B. Biochemistry: Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, New York, 1978. В гл. 14 прекрасно описаны пути превращения аминокислот и их ферментативные механизмы.

Dagley S., Nicholson D. E. An Introduction to Metabolic Pathways, Wiley, New York, 1970. (Имеется перевод: Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути.– М.: Мир, 1973.) Справочник.

Grisolia S., Baguena R., Mayor F. The Urea Cycle, Wiley, New York, 1976. Труды симпозиума по циклу мочевины, посвященные памяти Ганса Кребса. Содержат интересные материалы.

Hochachka P. W., Somero G. N. Strategies of Biochemical Adaptation, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1973. (Имеется перевод: Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации.– М.: Мир, 1977.) Сравнительная биохимия.

Scriver C. R., Rosenberg L. E. Amino Acid Metabolism and Its Disorders, Saunders, Philadelphia, 1973.

Статьи

Holmes F. L. Hans Krebs and the Discovery of the Ornithine Cycle, Fed. Proc., **39**, 216–225 (1980). События, которые привели к открытию цикла, излагаемые известным историком медицины.

Вопросы и задачи

1. *Продукты трансаминирования аминокислот.* Назовите α-кетокислоты, образующиеся из перечисленных ниже аминокислот в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом. Напишите структурные формулы этих α-кетокислот.
   а) Аспарагиновая кислота.
   б) Глутаминовая кислота.
   в) Аланин.
   г) Фенилаланин.
2. *Измерение скорости аланинтрансаминазной реакции.* Активность аланин-трансаминазы (скорость аланинтрансаминазной реакции) измеряют обычно, вводя в реакционную систему избыток очищенной лактатдегидрогеназы и NADH. Скорость исчезновения аланина равна скорости исчезновения NADH, которую измеряют спектрофотометрическим методом. Объясните, что здесь происходит.
3. *Распределение аминного азота.* Будут ли у вас обнаруживаться признаки недостаточности аспартата на рационе, который богат аланином, но беден аспартатом? Дайте аргументированный ответ.
4. *Одно из генетических нарушений аминокислотного обмена.* В больницу доставлен двухлетний ребенок. По словам матери, он страдает частыми рвотами. Рвоты случаются главным образом после приема пищи. Ребенок отстает в весе и физическом развитии. Волосы темные, но попадаются седые пряди. Проба мочи после добавления $FeCl_3$ приобрела зеленый цвет, что указывает на присутствие в моче фенилпировиноградной кислоты. Количественный анализ мочи дал следующие результаты:

Вещество	Содержание в моче, ммоль/л	
	у больного	в норме
Фенилаланин	7,0	0,01
Фенилпируват	4,8	0
Фениллактат	10,3	0

   а) Какой фермент, по-видимому, неактивен? Предложите лечение для данного случая.
   б) Почему в моче в больших количествах появляется фенилаланин?
   в) Что служит источником фенилпирувата и фениллактата? Почему этот путь (отсутствующий у здоровых людей) начинает функционировать, когда концентрация фенилаланина повышается?
   г) Почему в волосах больного имеются седые пряди?
5. *Роль кобаламина в катаболизме аминокислот.* Злокачественная анемия есть результат нарушения процесса усвоения кобаламина, что связано с отсутствием особого, вырабатываемого желудком гликопротеина (его называют *внутренним фактором*). Как влияет это нарушение на катаболизм аминокислот? Касается ли это всех аминокислот в равной степени?
6. *Сравнение лактата и аланина в роли метаболического топлива. Затраты энергии ATP на выведение азота из организма.* По степени окисления трех атомов углерода, входящих в молекулы лактата и аланина, эти соединения идентичны; в животном организме оба этих источника углерода могут служить метаболическим топливом. Сравните суммарные выходы ATP (число молей ATP, образовавшихся на 1 моль субстрата) при полном окислении (до CO_2 и H_2O) лактата и аланина, учтя при этих расчетах расход ATP на выведение азота в форме мочевины.

Задача 6

Лактат   Аланин

7. *Путь углерода и азота при расщеплении глутамата.* В печени крысы происходит окислительное расщепление глутаминовой кислоты, меченной ^{14}C по 2-му углеродному атому и ^{15}N по аминогруппе. Ниже перечислен ряд метаболитов. В каких атомах названных метаболитов обнаружится каждая из меток?

Задача 7

Глутаминовая кислота

а) Мочевина.
б) Сукцинат.
в) Аргинин.
г) Цитруллин.
д) Орнитин.
е) Аспартат.

8. *Химическая стратегия катаболизма изолейцина.* Изолейцин расщепляется до пропионил-СоА и ацетил-СоА в последовательности реакций, состоящей из шести этапов.

Задача 8

Изолейцин —(6 стадий)→ Пропионил-СоА + Ацетил-СоА

а) Стратегия химического процесса расщепления изолейцина аналогична стратегии цикла лимонной кислоты и процесса β-окисления жирных кислот. Промежуточные продукты расщепления изолейцина (I–V) показаны ниже не в том порядке, в каком они образуются. Расположите их в надлежащей метаболической последовательности на основании того, что вам известно о цикле лимонной кислоты и об окислении жирных кислот.

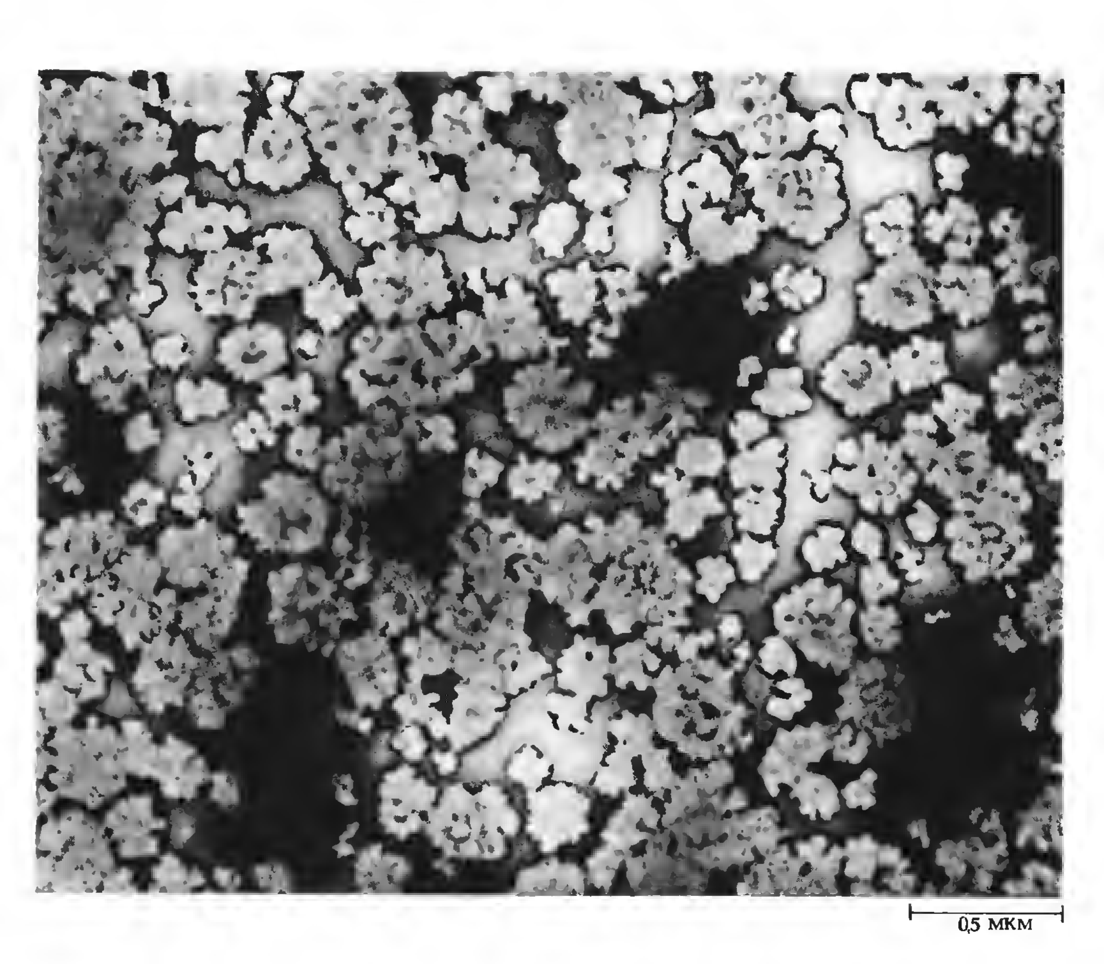
I II III IV V

б) Для каждого из указанных выше этапов опишите химический процесс, подберите аналогичный пример из цикла лимонной кислоты или из процесса β-окисления жирных кислот и укажите необходимые кофакторы.

9. *Отравление аммиаком, вызванное отсутствием аргинина в пище.* Опубликовано сообщение [J. Morris, Q. Rogers, Science 199, 431 (1978)] о следующем эксперименте. Кошкам, не получившим пищи накануне вечером, дали утром натощак аминокислотную смесь, содержавшую весь набор аминокислот, за исключением аргинина. Через 2 ч содержание аммиака в крови у животных возросло до 140 мкг/л (при норме 18 мкг/л) и появились клинические симптомы аммиачного отравления. Одна из кошек, съевшая всего лишь 8 г такой аминокислотной смеси, через 4,5 ч погибла. В контрольной группе, получившей полный набор аминокислот или смесь, в которой аргинин был заменен орнитином, никаких необычных клинических симптомов обнаружено не было.

а) Какую роль играло в этом эксперименте предварительное голодание?
б) В чем причина повышения уровня аммиака в крови? Почему отсутствие аргинина в рационе приводит к аммиачному отравлению? Является ли аргинин для кошек незаменимой аминокислотой?
в) Почему аргинин может быть заменен орнитином?

10. *Окисление глутамата.* Напишите отдельные сбалансированные уравнения и суммарное уравнение для окисления глутамата, при котором из 2 молей глутамата образуются 2 моля α-кетоглутарата и 1 моль мочевины (выводимой из организма).



Электронная микрофотография гранул гликогена, выделенных из печени крысы (метод негативного контраста). Эти гранулы, представляющие собой запасную форму глюкозного «топлива» в печени, называются α-частицами. Они состоят из более мелких β-частиц. Гранулы содержат не только гликоген, но и ферменты, необходимые для его синтеза и расщепления, равно как и ферменты, осуществляющие реципрокную регуляцию этих процессов.

ГЛАВА 20

БИОСИНТЕЗ УГЛЕВОДОВ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

В рассмотрении клеточного метаболизма мы достигли теперь как бы поворотного пункта. До сих пор мы знакомились с тем, как главные типы питательных веществ – углеводы, жирные кислоты и аминокислоты,– расщепляясь, включаются по сходящимся *катаболическим* путям в цикл лимонной кислоты, чтобы передать свои богатые энергией электроны в дыхательную цепь. Перемещаясь по дыхательной цепи к кислороду, эти электроны поставляют энергию для синтеза АТР. Теперь нам предстоит рассмотреть *анаболические* пути. На этих путях химическая энергия в форме АТР и NADPH используется для синтеза клеточных компонентов из простых предшественников. Катаболизм и анаболизм протекают одновременно; при этом поддерживается динамическое стационарное состояние, так что расщепление клеточных компонентов, обеспечивающее клетки энергией, уравновешивается биосинтетическими процессами, которые создают и поддерживают в живых клетках присущую им упорядоченность.

Здесь уместно вспомнить (гл. 10) и лишний раз подчеркнуть некоторые организационные принципы биосинтеза.

1. *Пути биосинтеза и пути расщепления тех или иных биомолекул, как правило, не идентичны.* Эти пути могут включать какую-нибудь общую обратимую реакцию или даже несколько таких реакций, но у них всегда имеется хотя бы одна ферментативная стадия, по которой они различаются. Если бы катаболические и анаболические реакции катализировались одним и тем же набором ферментов, действующих обратимо, то никакая биологическая структура независимо от ее сложности попросту не могла бы существовать, потому что число клеточных макромолекул менялось бы в ответ на любые колебания концентраций молекул-предшественников.

2. *Биосинтетические пути и соответствующие им катаболические пути контролируются разными регуляторными ферментами.* Обычно регуляция соответствующих биосинтетических и катаболических путей осуществляется координированным образом, реципрокно, так что стимулирование биосинтетического пути сопровождается подавлением катаболического пути, и наоборот. Более того, биосинтетические пути регулируются обычно на одном из первых этапов. Это избавляет клетку от непроизводительных трат: она не расходует предшественники на синтез тех промежуточных продуктов, которые ей не понадобятся. Мы вновь убеждаемся на этом примере, что принцип экономии лежит в основе молекулярной логики живых клеток.

3. *Требующие затраты энергии биосинтетические процессы обязательно сопряжены с поставляющим энергию расщеплением АТР, вследствие чего весь процесс в целом является практически необратимым, точно так же как в целом необратим катаболизм.* Таким образом, общее количество энергии АТР (или NADPH), используемое на данном биосинтетическом пути, всегда превосходит то минимальное количество свободной

энергии, которое требуется для превращения предшественника в биосинтетический продукт.

Рассмотрение биосинтетических процессов мы начнем с центрального биосинтетического пути, который в животных тканях приводит к образованию различных углеводов из неуглеводных предшественников. У всех высших животных биосинтез D-глюкозы – абсолютно необходимый процесс, потому что D-глюкоза крови служит единственным или главным источником топлива для нервной системы (в том числе и для мозга), а также для почек, семенников, эритроцитов и для всех тканей змбриона. У человека один только мозг потребляет более 120 г глюкозы в сутки. В организме животных D-глюкоза непрерывно синтезируется в строго регулируемых реакциях из более простых предшественников, таких, как пируват и некоторые аминокислоты, а затем поступает в кровь. Из неуглеводных предшественников образуются также и другие важные углеводы (рис. 20-1). Особенно большое значение имеет биосинтез гликогена, протекающий в печени и мышцах. Гликоген печени служит резервуаром глюкозы: из него образуется глюкоза, которая поступает в кровь. Мышечный же гликоген, распадаясь в процессе гликолиза, служит источником энергии ATP для мышечного сокращения. У животных образование D-глюкозы из неуглеводных предшественников называют *глюконеогенезом* (образование «нового» сахара). Важными предшественниками D-глюкозы являются у них лактат, пируват, глицерол, большинство аминокислот и промежуточные продукты цикла лимонной кислоты (рис. 20-1). Глюконеогенез протекает у животных главным образом в печени и значительно менее интенсивно – в корковом веществе почек.

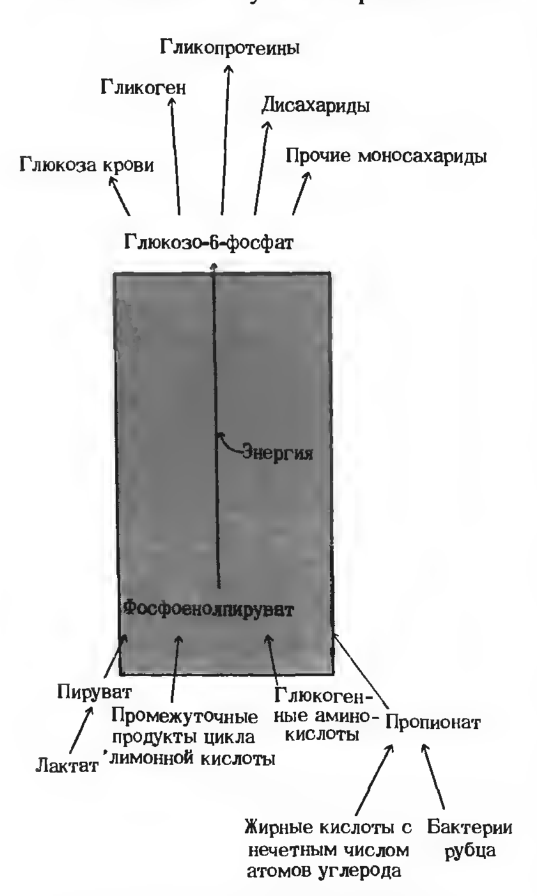


Рис. 20-1. Путь, ведущий от фосфоенолпирувата к глюкозо-6-фосфату, является общим для превращения многих предшественников в различные углеводы в животных тканях.

Мы знаем, что в растительном мире огромные количества глюкозы, а также других углеводов образуются путем восстановления двуокиси углерода в процессе фотосинтеза (гл. 23). В отличие от растений у животных не происходит реального (net) превращения CO_2 в новые молекулы глюкозы.

20.1. Путь глюконеогенеза включает семь этапов, общих с процессом гликолиза

Подобно тому как превращение глюкозы в пируват представляет собой центральный путь в катаболизме углеводов, превращение пирувата в глюкозу является центральным путем глюконеогенеза. Пути эти не идентичны, хотя и включают ряд общих этапов (рис. 20-2). Семь ферментативных реакций гликолиза свойственны также и глюконеогенезу; все они легко обратимы.

В гликолизе имеются, однако, три этапа, практически необратимых, которые по этой причине не могут использоваться

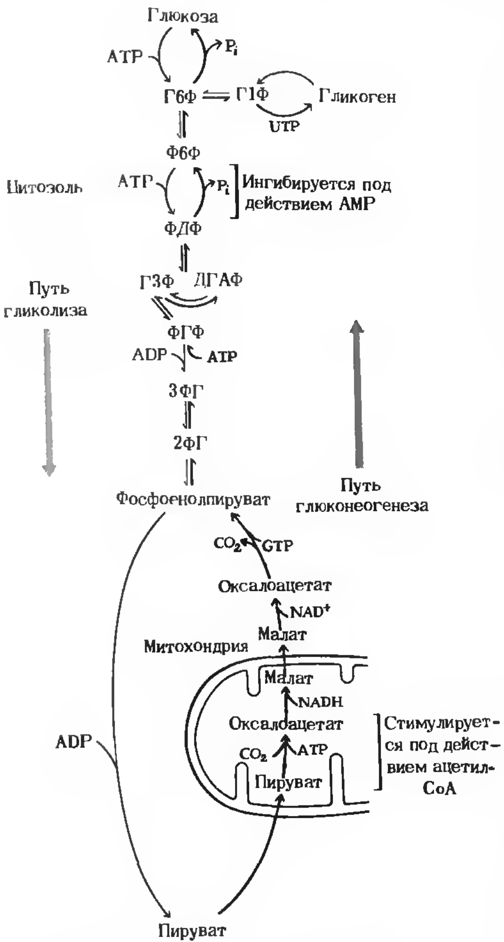


Рис. 20-2. Противоположно направленные пути гликолиза и глюконеогенеза в печени крысы (путь глюконеогенеза показан красным). У некоторых видов фосфоенолпируват образуется в цитозоле без участия митохондрий. На схеме показаны также два главных регуляторных пункта глюконеогенеза. Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г1Ф – глюкозо-1-фосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; ФДФ – фруктозодифосфат; Г3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат; ФГФ – 3-фосфоглицероилфосфат; 3ФГ – 3-фосфоглицерат; 2ФГ – 2-фосфоглицерат.

в глюконеогенезе. В обход этих этапов в глюконеогенезе протекают другие реакции, с иной стехиометрией, катализируемые другими ферментами; они участвуют только в глюконеогенезе, но не в гликолизе (рис. 20-2). Эти обходные реакции (мы их рассмотрим ниже) тоже необратимы, но они идут в направлении синтеза глюкозы. Таким образом, и гликолиз, и глюконеогенез – необратимые процессы в клетках. Более того, мы увидим, что эти процессы регулируются независимо друг от друга: регуляция осуществляется через те ферментативные этапы, которые не являются общими для этих двух путей.

20.2. Обходный путь требуется для превращения пирувата в фосфоенолпируват

Первая обходная реакция в глюконеогенезе – это превращение пирувата в фосфоенолпируват (рис. 20-2). Она не может быть простым обращением пируваткиназной реакции (разд. 15.7, д).

$$\text{Фосфоенолпируват} + \text{ADP} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Пируват} + \text{ATP}$$
$$\Delta G^{0\prime} = -7{,}5 \text{ ккал/моль},$$

которая характеризуется большой отрицательной величиной изменения стандартной свободной энергии и потому в интактной клетке необратима. Вместо этого фосфорилирование пирувата достигается обходным путем – в последовательности реакций, которые у некоторых животных требуют совместного действия цитозольных и митохондриальных ферментов клеток печени (рис. 20-2). Первый этап в этой обходной последовательности реакций катализируется митохондриальной *пируваткарбоксилазой*. Этот биотинсодержащий фермент катализирует образование оксалоацетата из пирувата (рис. 20-3) – *анаплеротическую реакцию* (разд. 16.11), способную пополнять пул промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты

$$\text{Пируват} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Ацетил-CoA}}$$
$$\rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{ADP} + P_i. \qquad (1)$$

Пируваткарбоксилаза – регуляторный фермент; в отсутствие ацетил-CoA, который служит для нее положительным регулятором, она почти полностью лишена активности.

Оксалоацетат, образующийся в мито-

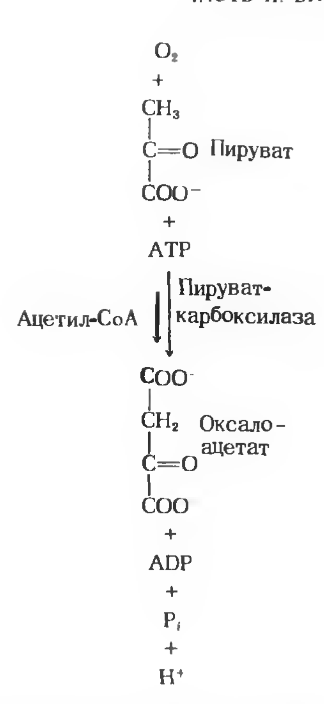


Рис. 20-3. Карбоксилирование пирувата, приводящее к образованию оксалоацетата. Включившаяся в состав оксалоацетата CO_2 снова отщепляется в одной из последующих реакций (рис. 20-4).

хондриях из пирувата, обратимо восстанавливается за счет NADH с образованием малата под действием митохондриальной малатдегидрогеназы (разд. 16.5, з)

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{Оксалоацетат} \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{Малат}. \quad (2)$$

Малат покидает митохондрии при участии специальной дикарбоксилатной транспортной системы, находящейся во внутренней митохондриальной мембране (разд. 17.19), и поступает в цитозоль. Здесь он реокисляется под действием цитозольной формы NAD-зависимой малатдегидрогеназы с образованием оксалоацетата, теперь уже внемитохондриального:

$$\text{Малат} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{NADH} + \text{H}^+. \quad (3)$$

На образовавшийся таким путем оксалоацетат действует *фосфоенолпируват-карбоксикиназа* (разд. 16.11). Продуктом этой Mg^{2+}-зависимой реакции, в которой донором фосфата служит *гуанозинтрифосфат* (GTP), является фосфоенолпируват (рис. 20-4).

$$\text{Оксалоацетат} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{Фосфоенолпируват} + CO_2 + \text{GDP}. \quad (4)$$

При внутриклеточных условиях эта реакция обратима. В клетках печени крысы фосфоенолпируват-карбоксикиназа найдена только в цитозоле, но в печени некоторых других видов этот фермент обнаруживается и в цитозоле, и в митохондриях.

Теперь мы можем написать суммарное уравнение для этих обходных реакций, посредством которых из пирувата образуется фосфоенолпируват, т. е. для реакций (1)–(4)

$$\text{Пируват} + \text{ATP} + \text{GTP} \rightarrow \text{Фосфоенолпируват} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i \quad (5)$$

$$\Delta G^{0'} = +0{,}2 \text{ ккал/моль}.$$

COO^-
CH_2 Оксалоацетат
C=O
COO^-
+
GTP
↓ Фосфоенолпируват-карбоксикиназа
CH_2 = C(–COO^-)–O–P(O^-)(=O)–O^- Фосфоенолпируват
+
CO_2
+
GDP^{3-}

Рис. 20-4. Превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват. Фиксированная в пируваткарбоксилазной реакции CO_2 (рис. 20-3) теперь снова отщепляется в виде CO_2.

Мы видим, что на фосфорилирование одной молекулы пирувата до фосфоенолпирувата (на этот процесс в стандартных условиях расход энергии составляет 14,8 ккал/моль) затрачивается энергия двух высокоэнергетических фосфатных групп (одной от ATP и одной от GTP), каждая из которых характеризуется величиной $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза −7,3 ккал/моль. Между тем, когда фосфоенолпируват превращается в пируват в процессе гликолиза, из ADP синтезируется только одна молекула ATP. Хотя изменение *стандартной* свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ суммарной реакции образования фосфоенолпирувата составляет +0,2 ккал/моль, *истинное* изменение свободной энергии $\Delta G'$ в условиях клетки выражается очень большой отрицательной величиной, около −6,0 ккал; ясно, таким образом, что эта реакция практически необратима.

20.3. Второй обходный путь в глюконеогенезе – это превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат

Вторая реакция гликолиза (пути, ведущего «вниз»), которая не может использоваться для глюконеогенеза (пути, ведущего «вверх»), – это реакция фосфорилирования фруктозо-6-фосфата, катализируемая фосфофруктокиназой

ATP + Фруктозо-6-фосфат →

→ ADP + Фруктозо-1,6-дифосфат.

В интактных клетках эта реакция необратима. Поэтому в глюконеогенезе действует обходный путь (рис. 20-2) с участием фермента фруктозодифосфатазы, который катализирует практически необратимый гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата с отщеплением фосфатной группы в положении 1, что приводит к образованию фруктозо-6-фосфата

Фруктозо-1,6-дифосфат +

$+ H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}}$ Фруктозо-6-фосфат + P_i

$\Delta G^{0\prime} = -3,9$ ккал.

Фруктозодифосфатаза имеет молекулярную массу 150000 и для проявления активности нуждается в ионах Mg^{2+}. Это тоже регуляторный фермент. Он резко ингибируется отрицательным модулятором AMP, а положительным модулятором служит для него ATP.

20.4. Третий обходный путь – это путь, ведущий от глюкозо-6-фосфата к свободной глюкозе

Третьей обходной реакцией, последней, в процессе синтеза D-глюкозы, является дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата с образованием свободной глюкозы, поступающей из печени в кровь (рис. 20-2). Это дефосфорилирование не может происходить путем обращения гексокиназной реакции (разд. 15.5,а), поскольку в печени эта реакция необратима. Вместо этого дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата осуществляется при участии *глюкозо-6-фосфатазы*, катализирующей необратимую гидролитическую реакцию

Глюкозо-6-фосфат + H_2O →

→ Глюкоза + P_i

$\Delta G^{0\prime} = -2,9$ ккал/моль.

Этот Mg^{2+}-зависимый фермент характерен своей локализацией: он обнаруживается в той фракции клеток печени позвоночных, которая содержит эндоплазматический ретикулум. Глюкозо-6-фосфатаза отсутствует в таких тканях, как мышцы или мозг, так что они не поставляют в кровь свободную глюкозу.

20.5. Глюконеогенез требует значительных затрат энергии

В табл. 20-1 представлены реакции, ведущие от пирувата к глюкозе крови. Суммарная реакция имеет вид

2Пируват + 4ATP + 2GTP +

+ 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ →

→ Глюкоза + $2NAD^+$ + 4ADP +

+ 2GDP + $6P_i$.

Таблица 20-1. Последовательные реакции глюконеогенеза, ведущие от пирувата к глюкозе[1)]

Пируват + CO_2 + ATP → Оксалоацетат + ADP + P_i	×2
Оксалоацетат + GTP ⇌ Фосфоенолпируват + CO_2 + GDP	×2
Фосфоенолпируват + H_2O ⇌ 2-фосфоглицерат	×2
2-фосфоглицерат ⇌ 3-фосфоглицерат	×2
3-фосфоглицерат + ATP ⇌ 3-фосфоглицероилфосфат + ADP	×2
3-фосфоглицероилфосфат + NADH + H^+ → Глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ + + P_i	×2
Глицеральдегид-3-фосфат ⇌ Дигидроксиацетонфосфат	
Глицеральдегид-3-фосфат + Дигидроксиацетонфосфат ⇌ Фруктозо-1,6-дифосфат	
Фруктозо-1,6-дифосфат + H_2O → Фруктозо-6-фосфат + P_i	
Фруктозо-6-фосфат ⇌ Глюкозо-6-фосфат	
Глюкозо-6-фосфат + H_2O → Глюкоза + P_i	

Суммарная реакция:
2Пируват + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ → Глюкоза + $2NAD^+$ + + 4ADP + 2GDP + $6P_i$

[1)] Обходные реакции выделены красным; все прочие реакции представляют собой обращение соответствующих стадий гликолитической последовательности. Цифры справа указывают, что данная реакция должна быть повторена дважды, потому что для образования одной молекулы глюкозы требуется два трехуглеродных предшественника.

На каждую молекулу глюкозы, образующуюся из пирувата, расходуется *шесть* высокоэнергетических фосфатных групп – четыре от ATP и две от GTP. Кроме того, для восстановительных этапов требуются еще две молекулы NADH. Ясно, что это уравнение не является простым обращением уравнения, описывающего превращение глюкозы в пируват в процессе гликолиза, поскольку такое превращение сопровождается образованием всего лишь двух молекул ATP

$$\text{Глюкоза} + 2ADP + 2P_i + 2NAD^+ \to 2\text{Пируват} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O.$$

Таким образом, синтез глюкозы из пирувата обходится организму довольно дорого. Однако немалая часть этой платы расходуется лишь на то, чтобы обеспечить необратимость глюконеогенеза. В условиях, существующих в клетке, в которых величина ΔG_p для ATP может достигать 16 ккал/моль (разд. 14.10), общее изменение свободной энергии в процессе гликолиза составляет по меньшей мере – 15 ккал/моль. В тех же условиях общее изменение свободной энергии при глюконеогенезе (синтезе глюкозы из пирувата) выражается гораздо большей величиной. Поэтому в нормальных внутриклеточных условиях и гликолиз, и глюконеогенез представляют собой необратимые процессы.

20.6. Реципрокная регуляция глюконеогенеза и гликолиза

На рис. 20-2 указаны регуляторные пункты глюконеогенеза и гликолиза. Первым таким пунктом в глюконеогенезе является реакция, катализируемая регуляторным ферментом пируваткарбоксилазой. Этот фермент практически неактивен в отсутствие ацетил-СоА, который играет роль его положительного аллостерического модулятора. Поэтому биосинтез глюкозы из пирувата усиливается всякий раз, когда в клетке накапливается больше митохондриального ацетил-СоА, чем ей в данный момент требуется в качестве топлива для цикла лимонной кислоты. Поскольку ацетил-СоА служит вместе с тем также отрицательным, или ингибирующим, модулятором пируват-

дегидрогеназного комплекса, накопление ацетил-СоА замедляет окисление пирувата до ацетил-СоА и способствует биосинтетическому превращению пирувата в глюкозу.

Вторым регуляторным пунктом глюконеогенеза служит реакция, катализируемая фруктозодифосфатазой, ферментом, на который резкое ингибирующее действие оказывает AMP. Так как соответствующий фермент гликолитического пути, фосфофруктокиназа, активируется AMP и ADP, а ингибируется цитратом и ATP (разд. 15.3), два этих противоположно направленных этапа глюконеогенеза и гликолиза регулируются координированным образом, реципрокно. Всякий раз, когда для цикла лимонной кислоты имеется достаточно топлива (либо в виде ацетил-СоА, либо в виде цитрата – первого промежуточного продукта этого цикла) или когда клетка полностью обеспечена ATP, условия благоприятствуют биосинтетическому пути, т. е. образованию глюкозы из пирувата, а следовательно, и запасанию глюкозы в форме гликогена.

В известной мере глюконеогенез регулируется и непрямым способом, через пируваткиназу – один из гликолитических ферментов, не участвующих в глюконеогенезе. Пируваткиназа существует в двух формах – L (от англ. liver – печень) и M (от англ. muscle – мышца). L-форма, преобладающая в тканях, способных к глюконеогенезу, аллостерически ингибируется избытком ATP и некоторыми аминокислотами, главным образом аланином, который в глюконеогенезе является одним из предшественников глюкозы. В условиях достаточного обеспечения энергией и при наличии предшественников глюкозы гликолиз – вследствие ингибирования L-пируваткиназы – замедляется, т. е. создается ситуация, благоприятствующая глюконеогенезу. M-пируваткиназа такой регуляции не подчиняется.

В гл. 25 мы увидим, что глюконеогенез регулируется еще и некоторыми гормонами.

20.7. Промежуточные продукты цикла лимонной кислоты являются также предшественниками глюкозы

Описанный выше биосинтетический путь используется для синтеза глюкозы не только из пирувата; он может служить и для синтеза глюкозы из разных предшественников пирувата или фосфоенолпирувата (рис. 20-1). Главную роль играют среди них промежуточные продукты цикла лимонной кислоты цитрат, изоцитрат, α-кетоглутарат, сукцинат, фумарат и малат. Все они могут подвергаться окислению в цикле лимонной кислоты с образованием оксалоацетата, который затем под действием фосфоенолпируват-карбоксиназы превращается в фосфоенолпируват, как показано на рис. 20-2. Однако в состав глюкозы может войти лишь по три углеродных атома от каждого из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты.

Важно отметить, что в норме ацетил-СоА не используется как предшественник глюкозы в животном организме, так как он не может превратиться в пируват. Напомним, что пируватдегидрогеназная реакция в условиях клетки необратима (разд. 16.2). Таким образом, обычно в животном организме не происходит реального превращения жирных кислот с четным числом атомов углерода в глюкозу, потому что при окислительном расщеплении таких кислот образуется только ацетил-СоА.

20.8. Большинство аминокислот относится к глюкогенным

Мы знаем из гл. 19, что в животном организме углеродные скелеты многих аминокислот, получающихся при распаде белков, превращаются в конце концов полностью или частично в пируват или в определенные промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Это делает возможным реальное превращение таких аминокислот в глюкозу и гликоген, вследствие чего они и были названы *глюкогенными* (табл. 20-2). В качестве примеров можно указать аланин, глутамат

Таблица 20-2. Глюкогенные аминокислоты[1]

Превращаются в пируват
- Аланин
- Серин
- Цистеин
- Глицин

Превращаются в оксалоацетат
- Аспарагин
- Аспартат

Превращаются в сукцинил-СоА
- Валин
- Треонин
- Метионин

Превращаются в α-кетоглутарат
- Глутамат
- Глутамин
- Пролин
- Аргинин
- Гистидин

Поставляют атомы углерода для синтеза глюкозы и кетоновых тел
- Фенилаланин
- Тирозин
- Изолейцин
- Триптофан
- Лизин

[1] Эти аминокислоты служат предшественниками глюкозы крови или гликогена печени, потому что они могут превращаться в пируват или в промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Они объединены здесь в группы в зависимости от места их вхождения в цикл. Совершенно не способен поставлять углерод для реального синтеза глюкозы один только лейцин.

и аспартат, из которых в результате дезаминирования образуются соответственно пируват, α-кетоглутарат и оксалоацетат; все эти соединения служат предшественниками фосфоенолпирувата в реакциях, описанных выше. При сахарном диабете реальное превращение глюкогенных аминокислот в глюкозу происходит весьма интенсивно, с гораздо большей скоростью, чем у здоровых людей. Как следствие этого у больных диабетом выводятся с мочой большие количества мочевины, образующейся при дезаминировании глюкогенных аминокислот.

20.9. Глюконеогенез происходит в период восстановления после мышечной работы

Синтез глюкозы из малых молекул-предшественников идет с особенно большой скоростью в период восстановления после мышечной нагрузки, требующей напряжения всех сил, например после бега на 100 м (дополнение 15-1). При такой интенсивной мышечной работе потребность скелетных мышц в АТР неизмеримо возрастает и циркуляторная система уже не успевает доставлять к ним глюкозу и кислород достаточно быстро для того, чтобы эту потребность удовлетворить. В этом случае в качестве резервного топлива используется мышечный гликоген, быстро расщепляющийся в процессе гликолиза с образованием лактата; это сопровождается синтезом АТР, который и служит источником энергии для мышечного сокращения. Поскольку в таких условиях кислорода не хватает, лактат не может подвергнуться в мышцах дальнейшим превращениям и диффундирует в кровь, так что его содержание в крови может быть очень высоким. Закончивший стометровку спринтер вначале дышит еще очень тяжело, но постепенно его дыхание выравнивается и через некоторое время вновь становится нормальным. В течение этого периода восстановления возвращается к нормальному низкому уровню также и содержание лактата в крови. Значительная часть избытка кислорода, потребляемого в период восстановления (этот избыток служит мерой так называемой *кислородной задолженности*), расходуется на образование АТР, который необходим для того, чтобы из лактата, образовавшегося анаэробно во время спринтерского бега, могли быть ресинтезированы глюкоза крови и мышечный гликоген. За время восстановления (а для полного восстановления может потребоваться до 30 мин) лактат удаляется из крови печенью и превращается в глюкозу крови путем глюконеогенеза, который мы описали выше. Глюкоза крови возвращается в мышцы, и здесь из нее образуется гликоген (рис. 20-5). Поскольку на образова-

ние одной молекулы глюкозы из двух молекул лактата расходуется в общей сложности шесть высокоэнергетических фосфатных групп АТР, а при распаде молекулы глюкозы в мышцах синтезируются всего две молекулы АТР, следует признать, что использование мышечного гликогена в качестве анаэробного топлива обходится клеткам в энергетическом отношении очень дорого. Кроме того, для пополнения запасов гликогена требуются достаточно длительные периоды восстановления (дополнение 15-1).

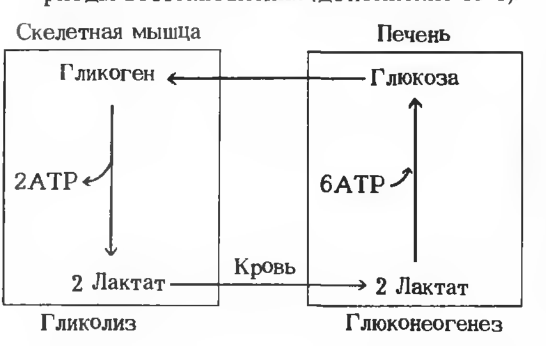


Рис. 20-5. Взаимодействие скелетных мышц и печени в процессе восстановления после тяжелой мышечной работы, во время которой происходит анаэробное расщепление гликогена с образованием двух молекул лактата и двух молекул АТР на каждую расщепленную глюкозную единицу. В период восстановления (показано красным) лактат, поступивший из мышц в кровь, превращается в печени в глюкозу крови. На образование одной молекулы глюкозы из двух молекул лактата расходуется шесть молекул АТР. Глюкоза доставляется кровью обратно в мышцы и откладывается здесь в запас в виде гликогена.

Можно, конечно, счесть это слишком высокой ценой за право выйти победителем на короткой дистанции. Однако не следует забывать, что эта способность к мгновенной мобилизации всех сил, пусть и на короткое время, дает огромное преимущество, обеспечивая выживание в эволюционной борьбе между хищником и жертвой (дополнение 15-1).

Крупные морские животные, такие, как тюлени и моржи, а также рептилии, ведущие земноводный образ жизни, например аллигаторы и черепахи, могут подолгу оставаться под водой не только потому, что в их организме имеется значительный запас кислорода в виде оксимиоглобина, но еще и благодаря своей способности генерировать АТР за счет расщепления гликогена в процессе гликолиза.

20.10. Особенно активный глюконеогенез свойствен жвачным животным

Мы знаем, например, что лабораторные крысы по своему метаболизму очень близки к человеку, но это можно сказать далеко не про всех хорошо известных нам животных. У жвачных животных, в том числе у крупного рогатого скота, растительная пища, перевариваясь, подвергается ферментации в рубце под действием находящихся там бактерий. Рубцом называется первый отдел четырехкамерного желудка жвачных. У коровы объем рубца достигает 70 л. Это как бы огромный ферментёр (рис. 20-6), в котором различные обитающие здесь виды бактерий расщепляют главные компоненты растительной пищи, в первую очередь целлюлозу (гидролизовать ее неспособен ни один из обычных пищеварительных ферментов животного организма). Живущие в рубце бактерии расщепляют целлюлозу (в которой остатки глюкозы соединены β(1 →

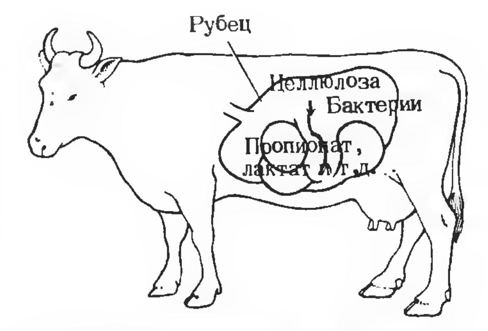


Рис. 20-6. Рубец, занимающий значительную часть брюшной полости коровы, представляет собой как бы огромный ферментёр, в котором бактерии расщепляют целлюлозу ферментативным путем до глюкозы. Эта глюкоза сбраживается затем с образованием лактата, пропионата, ацетата и бутирата, которые всасываются в кровь. В печени лактат и пропионат вновь быстро превращаются в глюкозу.

→ 4)-связями) с образованием свободной D-глюкозы. На этом, однако, деятельность бактерий не кончается. Они сбраживают почти всю глюкозу до лактата и ряда других продуктов, среди которых главную роль играют ацетат, пропионат и бутират. В сутки у коровы поступает из кишечника в кровь не более нескольких граммов несброженной глюкозы. Однако корова, точно так же как крыса или человек, нуждается в глюкозе крови. Она нужна ей не только как клеточное топливо для мозга и других тканей, но также и в качестве предшественника лактозы (молочного сахара) в период лактации.

Откуда же берется у коровы эта необходимая ей глюкоза, если перевариваемые углеводы почти нацело расщепляются у нее в рубце до короткоцепочечных органических кислот? Оказывается, организм коровы зависит в этом смысле от глюконеогенеза, протекающего в печени животного весьма интенсивно. Лактат, образуемый в рубце бактериями, всасывается в кровь и в печени превращается в глюкозу по описанному выше пути, точно так же как это происходит у человека или у крысы. Другой важный продукт сбраживания глюкозы в рубце, трехуглеродный *пропионат* (разд. 18.8), превращается в глюкозу в результате процесса, который свойствен как жвачным, так и нежвачным, но у первых играет значительно более важную (в количественном смысле) роль. Этот путь (рис. 20-7) интересен в двух отношениях: 1) в нем имеется этап, на котором двуокись углерода «фиксируется», т.е. переходит в органическую форму в результате карбоксилирования пропионил-CoA; 2) глюконеогенный путь, ведущий от пропионата к глюкозе, включает этап, катализируемый ферментом, содержащим в качестве простетической группы прочно связанную коферментную форму витамина B_{12} – *дезоксиаденозилкобаламин* (разд. 10.11). Этот фермент называется *метилмалонил-CoA – мутазой* (разд. 18.8). В реакции, которую он катализирует, сложная замещенная алкильная группа переносится от одного атома углерода к другому, соседнему, в обмен на атом водорода, что приводит к

CH_3–CH_2–COO^- Пропионат
ATP + CoA → AMP + PP_i (Ацил-CoA-синтетаза)
CH_3–CH_2–C(=O)–S–CoA Пропионил-CoA
H_2O + ATP + CO_2 → ADP + P_i (Пропионил-CoA-карбоксилаза)
COO^-–CH(CH_3)–C(=O)–S–CoA D-метилмалонил-CoA
⇅ Метилмалонил-CoA-рацемаза
COO^-–CH(CH_3)–C(=O)–S–CoA L-метилмалонил-CoA
⇅ Кофермент B_{12}, Метилмалонил-CoA-мутаза
COO^-–CH_2–CH_2–C(=O)–S–CoA Сукцинил-CoA

Рис. 20-7. Превращение пропионата в сукцинил-CoA, который затем может превратиться в фосфоенолпируват и в конечном счете – в глюкозу. CO_2, присоединившаяся при образовании D-метилмалонил-CoA, снова отщепляется, когда оксалоацетат превращается в фосфоенолпируват. Обратите внимание на обмен заместителями при двух соседних атомах углерода в молекуле L-метилмалонил-CoA, катализируемый метилмалонил-CoA – мутазой, для действия которой требуется кофермент B_{12}. См. также разд. 18.8.

образованию *сукцинил-СоА* (рис. 20-7). Возникший таким путем сукцинил-СоА превращается в малат, являющийся предшественником фосфоенолпирувата (рис. 20-2), и в конечном счете – в D-глюкозу. Следует отметить, что CO_2, фиксированная при карбоксилировании пропионил-СоА, позже снова теряется. У нежвачных животных образование глюкозы из пропионата идет далеко не столь интенсивно, потому что пропионат образуется у них только в результате окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода (разд. 18.8), а также в процессе окислительного расщепления трех аминокислот – метионина, изолейцина и валина.

20.11. Алкоголь тормозит глюконеогенез

Существует еще один аспект, о котором следует помнить, рассматривая глюконеогенез с точки зрения биологии человека и медицины. Потребление больших количеств алкоголя резко тормозит глюконеогенез в печени, вследствие чего понижается содержание глюкозы в крови. Такое состояние называется *гипогликемией*. Это действие алкоголя сказывается особенно резко после тяжелой физической нагрузки или на голодный желудок. Если человек выпьет спиртного после длительной и тяжелой физической работы, уровень глюкозы в крови может понизиться до 40 и даже до 30% от нормы. Гипогликемия неблагоприятно сказывается на функции мозга. Она особенно опасна для тех его областей, которые контролируют температуру тела, так что, например, под влиянием гипогликемии температура тела может понизиться на 2°С и более (при измерении в прямой кишке). Если человеку в таком состоянии дать выпить раствор глюкозы, то нормальная температура тела быстро восстановится. Старый обычай, предписывавший давать спасенным на море или в пустыне голодным или обессилевшим людям виски или бренди, физиологически неоправдан и даже опасен; в таких случаях следует давать глюкозу.

20.12. «Холостые» циклы в углеводном обмене

Внимательный читатель, рассматривая пути гликолиза и глюконеогенеза, представленные на рис. 20-2, неизбежно должен задать себе один очень непростой вопрос. На этих противоположно направленных метаболических путях между глюкозой и пируватом имеются три пункта, в которых ферментативные реакции катаболического направления заменены в анаболическом пути другими, обходными реакциями. Фосфофруктокиназа, например, катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата за счет АТР, а в глюконеогенезе ей соответствует фруктозодифосфатаза, катализирующая обходную реакцию – гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата, в результате которого и образуется фруктозо-6-фосфат. Запишем эти две противоположно направленные реакции:

$$\text{ATP} + \text{Фруктозо-6-фосфат} \rightarrow \text{ADP} + \text{Фруктозо-1,6-дифосфат},$$

$$\text{Фруктозо-1,6-дифосфат} + H_2O \rightarrow \text{Фруктозо-6-фосфат} + P_i.$$

Суммируя их, мы получим реакцию

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_i,$$

в которой энергия, как мы видим, расходуется впустую, потому что суммарный гидролиз АТР не сопровождается в этом случае никакой реальной метаболической работой. Ясно, что если две указанные реакции будут одновременно и с большой скоростью идти в одной и той же клетке, то это может привести к большим потерям энергии – она будет рассеиваться в виде тепла. Такой цикл, результатом которого является распад АТР, получил название холостого цикла. В подобном же холостом цикле могла бы, очевидно, участвовать и такая пара соответствующих ферментов, как гексокиназа и глюкозо-6-фосфатаза

ATP + Глюкоза →
→ Глюкозо-6-фосфат + ADP
Глюкозо-6-фосфат + H_2O →
→ Глюкоза + P_i

Суммарная реакция: ATP + H_2O →
→ ADP + P_i

В нормальных условиях холостые циклы, вероятно, не имеют места, так как их появлению препятствуют реципрокные регуляторные механизмы. Всякий раз, когда преобладает катаболизм, т.е. когда суммарный поток направлен в сторону гликолиза, фруктозодифосфатазная активность выключается. И наоборот, когда суммарный поток направлен в сторону глюконеогенеза, выключается фосфофруктокиназа.

Недавние исследования показали, однако, что иногда холостые циклы могут происходить и в физиологических условиях, имея при этом вполне определенный биологический смысл – производство тепла. Любопытный пример подобного холостого цикла обнаружен у некоторых насекомых. В холодную погоду шмель не может летать до тех пор, пока он не прогреет свой «мотор»; температура мышц должна подняться у него примерно до 30°C и поддерживаться на этом уровне за счет холостого цикла с участием фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата и последующим гидролизом ATP, который служит источником тепла. Полагают также, что холостые циклы, генерирующие тепло, имеют место, возможно, и у некоторых животных, пробуждающихся после зимней спячки, т.е. в период, когда температура тела животного бывает гораздо ниже нормы.

20.13. Путь биосинтеза гликогена отличается от пути его расщепления

Теперь, когда мы уже знаем, каким образом из простых предшественников синтезируется глюкоза, мы можем заняться рассмотрением биосинтетического пути, ведущего к превращению остатков глюкозы в гликоген. У животных гликоген синтезируется практически во всех тканях, но особенно активны в этом отношении печень и скелетные мышцы. Начинается синтез гликогена из свободной глюкозы с *гексокиназной* реакции, т.е. с фосфорилирования глюкозы, в результате которого образуется глюкозо-6-фосфат

ATP + D-глюкоза →
→ D-глюкозо-6-фосфат + ADP.

На следующем этапе глюкозо-6-фосфат обратимо превращается в глюкозо-1-фосфат в реакции, катализируемой *фосфоглюкомутазой* (разд. 15.8).

Глюкозо-6-фосфат ⇌
⇌ Глюкозо-1-фосфат.

Далее следует ключевая реакция биосинтеза гликогена, отсутствующая в процессе его расщепления. Эта реакция представляет собой образование *уридиндифосфатглюкозы* (UDP-глюкозы) (рис. 20-8), катализируемое *глюкозо-1-фосфат–уридилтрансферазой*

UTP + Глюкозо-1-фосфат →
→ UDP-глюкоза + PP_i.

Реакция вынуждена идти слева направо под действием пирофосфатазы, гидролизующей пирофосфат (PP_i) до ортофосфата (P_i). Ранее мы видели, что UDP-глюкоза играет роль промежуточного

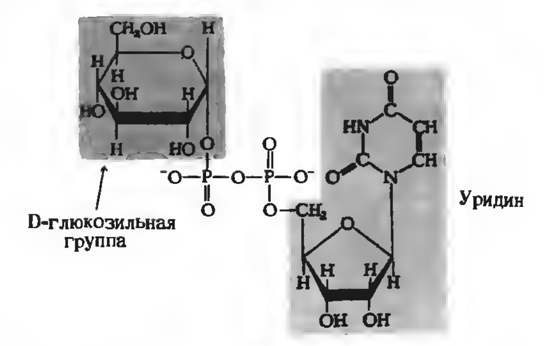


Рис. 20-8. Уридиндифосфатглюкоза (UDP-глюкоза), играющая роль донора глюкозильных групп в гликогенсинтазной реакции.

продукта в процессе превращения D-галактозы в D-глюкозу (рис. 15-12). Она же служит и непосредственным донором глюкозильных групп при ферментативном образовании гликогена; перенос глюкозильных групп от UDP-глюкозы на нередуцирующий конец разветвленной молекулы гликогена катализируется ферментом, который носит название *гликоген-синтазы* (рис. 20-9). В этой реакции образуется новая $\alpha(1 \rightarrow 4)$-связь между 1-м углеродным атомом добавляемого остатка глюкозы и 4-м углеродным атомом концевого остатка глюкозы данной боковой цепи гликогена

$$\text{UDP-глюкоза} + \underset{\text{Боковая цепь гликогена}}{(\text{Глюкоза})_n} \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{UDP} + \underset{\text{Удлиненная боковая цепь гликогена}}{(\text{Глюкоза})_{n+1}}$$

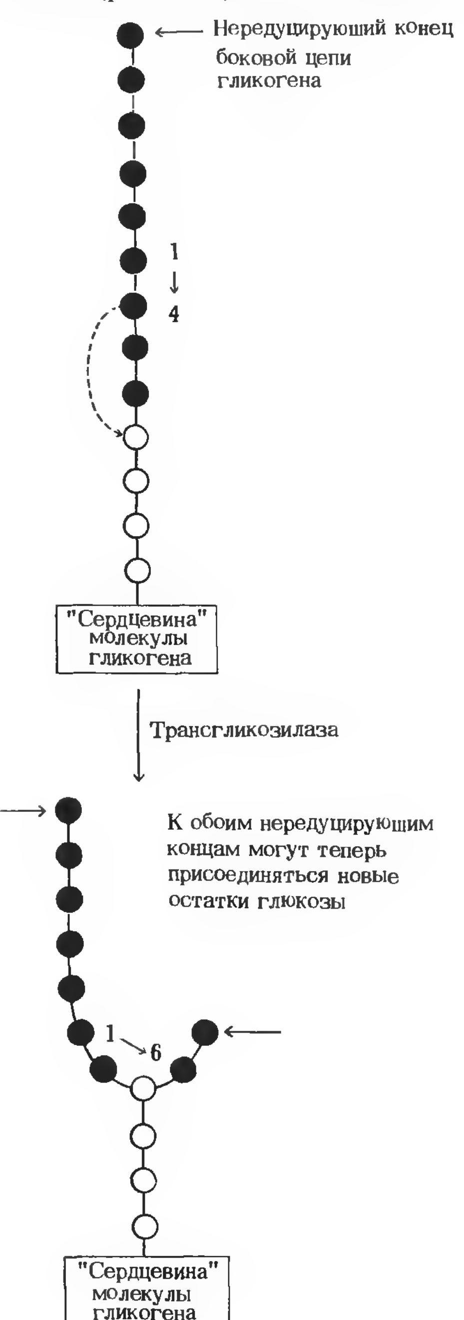
Рис. 20-9. Удлинение одной из боковых цепей гликогена, катализируемое гликоген-синтазой. D-глюкозильная группа UDP-D-глюкозы переносится на нередуцирующий конец боковой цепи гликогена с образованием новой $\alpha(1 \rightarrow 4)$-связи.

Общее равновесие этих трех реакций сильно сдвинуто в сторону синтеза гликогена. Гликоген-синтазе требуется в качестве затравки $\alpha(1 \rightarrow 4)$-полиглюкозная цепь, или ветвь молекулы гликогена, состоящая не менее чем из четырех глюкозных остатков, к которым фермент последовательно присоединяет глюкозильные группы с нередуцирующего конца.

Роль UTP- и UDP-глюкозы в биосинтезе гликогена и многих других углеводов выяснил аргентинский биохимик Луис Лелуар. За эти работы он был удостоен в 1970 г. Нобелевской премии. Выше мы уже познакомились с другими примерами биосинтеза углеводов и их производных, в которых промежуточными продуктами тоже служили нуклеозиддифосфатсахара (разд. 15.9).

Гликоген-синтаза неспособна катализировать образование $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связей, находящихся в точках ветвления цепей гликогена. Существует специальный «ветвящий» фермент – гликозил-$(4 \rightarrow 6)$–трансфераза. Он катализирует перенос концевого олигосахаридного фрагмента, состоящего из 6 или 7 остатков глюкозы, с нередуцирующего конца одной из боковых цепей, насчитывающей

не менее 11 остатков, на 6-гидроксильную группу остатка глюкозы той же или другой цепи гликогена, расположенного ближе к внутренней части молекулы, в результате чего образуется новая боковая цепь (рис. 20-10). После этого гликоген-синтаза может добавлять к этой боковой цепи новые остатки глюкозы. Биологический смысл ветвления заключается в повышении растворимости гликогена и в увеличении числа нередуцирующих концов у его молекул, что делает гликоген более доступным для действия гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы.



Крахмал в растениях синтезируется таким же путем, но донором глюкозильных групп служит при этом не UDP-глюкоза, а ADP-глюкоза.

20.14. Гликоген-синтаза и гликоген-фосфорилаза регулируются реципрокно

Ранее мы видели, что расщепление гликогена регулируется посредством ковалентной и аллостерической модуляции гликоген-фосфорилазы (разд. 15.11). *Фосфорилаза a*, активная форма фермента, содержащая существенные для каталитической активности фосфорилированные остатки серина, дефосфорилируется под действием *фосфатазы фосфорилазы* и превращается в *фосфорилазу b* – значительно менее активную форму, которую может активировать AMP (ее аллостерический модулятор). Киназа фосфорилазы превращает фосфорилазу *b* снова в фосфорилазу *a* за счет ATP, фосфорилирующего упомянутые остатки серина.

Гликоген-синтаза также существует в двух формах – фосфорилированной и дефосфорилированной, но она регулируется реципрокно по отношению к гликоген-фосфорилазе, т.е. прямо противоположным образом (рис. 20-11). Ее активная форма, *гликоген-синтаза a*, дефосфорилирована. В результате катализируемого протеинкиназой фосфорилирования за счет ATP по двум гидро-

Рис. 20-10. Схема, поясняющая, каким образом при синтезе гликогена в его молекуле возникает новая точка ветвления. В ее образовании участвует ветвящий фермент. Часть цепи, выделенная красным, переносится на остаток глюкозы, находящийся в той же цепи, но ближе к «сердцевине», как показано пунктирной стрелкой. Перенесенный фрагмент присоединяется $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связью.

ксильным группам серина гликоген-синтаза *a* превращается в менее активную форму, *гликоген-синтазу b*

Гликоген-синтаза *a* +
Активная форма

+ 2ATP $\xrightarrow{\text{Протеин-киназа}}$ Гликоген-синтаза *b* +
Менее активная форма

+ 2ADP.

Переход менее активной гликоген-синтазы *b* обратно в активную форму катализируется *фосфопротеин-фосфатазой*, которая отщепляет фосфатные группы от остатков серина

Гликоген-синтаза *b* + $2H_2O$ →

→ Гликоген-синтаза *a* + P_i.

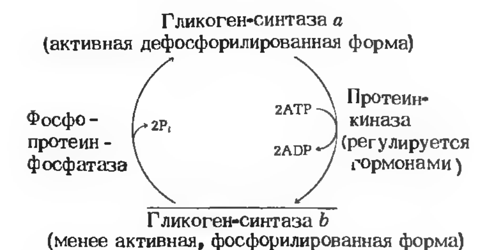


Рис. 20-11. Регуляция активности гликоген-синтазы путем ферментативного фосфорилирования и дефосфорилирования. Сама протеинкиназа также существует в двух формах, активной и неактивной; их соотношение регулируется гормонами (гл. 25).

Стимулируется синтез гликогена

Синтаза *a* активная —OH

Фосфорилаза *b* неактивная —OH

P_i H_2O ATP ADP

Синтаза *b* неактивная —O—Ⓟ

Фосфорилаза *a* активная —O—Ⓟ

Стимулируется расщепление гликогена

Таким образом, гликоген-фосфорилаза и гликоген-синтаза регулируются реципрокно: в то время как один из ферментов активируется, активность другого подавляется (рис. 20-12). Сказанное означает, что проявлять полную активность одновременно оба эти фермента, по-видимому, не могут.

Гликоген-синтаза изменяет свою активность также и под влиянием аллостерических модуляторов. Менее активная форма, гликоген-синтаза *b*, активируется своим аллостерическим модулятором, глюкозо-6-фосфатом. Поскольку активность этой формы гликоген-синтазы зависит от глюкозо-6-фосфата, ее называют зависимой формой или *D*-формой (от англ. dependent – зависимая). Гликоген-синтаза *a* не активируется глюкозо-6-фосфатом, т. е. не зависит от него, и потому ее называют независимой формой или I-формой (от англ. independent – независимая).

Соотношение между скоростями синтеза и распада гликогена в печени регулируется в конечном счете двумя гормонами: *адреналином* (вырабатывается мозговым веществом надпочечников) и *глюкагоном* (вырабатывается поджелудочной железой). Эти гормоны действуют, изменяя соотношение активной и неактивной форм гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы. Секреция адреналина стимулирует расщепление гликогена в печени и мышцах, повышая отношение фосфорилазы *a* к фосфорилазе *b* и одно-

Рис. 20-12. Реципрокная регуляция гликоген-синтазы и гликоген-фосфорилазы путем фосфорилирования и дефосфорилирования. Активная форма каждого из ферментов показана красным, неактивная – черным. Символом —O—Ⓟ обозначены фосфорилированные остатки серина.

временно понижая отношение гликоген-синтазы *a* к гликоген-синтазе *b*. Глюкагон вызывает тот же конечный эффект, но действует иначе. Подробно гормональную регуляцию обмена гликогена мы рассмотрим в гл. 25.

20.15. Существуют генетические болезни, при которых обмен гликогена нарушен

У человека известен ряд генетических болезней, связанных с нарушением синтеза или распада гликогена. Одним из первых был описан случай хронического увеличения печени – у 8-летней девочки, у которой наблюдались также различного рода нарушения обмена. Девочка умерла от гриппа. Вскрытие показало, что ее печень была в 3 раза больше нормы; в ней содержалось огромное количество гликогена: на долю его приходилось почти 40% сухого веса органа. Выделенный из печени гликоген в химическом отношении оказался вполне нормальным, однако, когда кусочек ткани печени гомогенизировали и инкубировали в буфере, этот гликоген так и остался интактным – ни лактат, ни глюкоза не образовались. Когда же к гликогену добавили суспензию, приготовленную из ткани нормальной печени, то очень быстро произошло его расщепление до глюкозы. На основании этой биохимической проверки исследователи пришли к выводу, что у больной был нарушен процесс расщепления гликогена (эту болезнь часто называют *болезнью Гирке* по имени описавшего ее врача). Сначала предполагалось, что дефектным ферментом была в этом случае глюкозо-6-фосфатаза, поскольку больная печень не образовывала глюкозы; однако отсутствие образования лактата указывало на то, что дефект затрагивал либо гликоген-фосфорилазу, либо дебранчинг-фермент [α(1 → 6)-глюкозидазу]. Позже исследователи укрепились в мнении, что в этом классическом случае была затронута именно α(1 → 6)-глюкозидаза. Вследствие этого в молекулах гликогена, находящихся в печени, могли расщепляться с образованием глюкозы или

Таблица 20-3. Врожденные нарушения обмена гликогена и глюконеогенеза у человека

Дефектный фермент	Болезнь депонирования гликогена
Глюкозо-6-фосфатаза	Тип I
α(1 → 6)-глюкозидаза	Тип II
α(1 → 6)-глюкозидаза	Тип III
Ветвящий фермент	Тип IV
Фосфорилаза мышц	Тип V
Фосфорилаза печени	
Киназа фосфорилазы печени	
Фосфофруктокиназа мышц	
Гликоген-синтаза печени	
Фруктозо-1,6-дифосфатаза	
Пируваткарбоксилаза	
Фосфоенолпируват-карбоксикиназа	

лактата только внешние боковые цепи и, значит, накапливалось много молекул гликогена, которые уже не могли расщепляться дальше; в сущности, от молекулы оставалась ее «сердцевина» (или «остаточный декстрин»), но в этом случае необычно крупная.

К настоящему времени известно не менее 12 различных видов врожденных нарушений синтеза или расщепления гликогена. В каждом из таких случаев затронут определенный фермент (табл. 20-3). Особо серьезные нарушения, обычно приводящие к смерти, связаны с недостаточностью глюкозо-6-фосфатазы, α(1 → → 6)-глюкозидазы и ветвящего фермента. Летальны также генетические дефекты, затрагивающие пируваткарбоксилазу и фосфоенолпируват-карбоксикиназу, т. е. ферменты, катализирующие ранние этапы глюконеогенеза.

20.16. Синтез лактозы регулируется особым образом

Почти все ткани позвоночных содержат *галактозилтрансферазу* – фермент,

катализирующий перенос D-галактозильных групп на N-ацетилглюкозамин

UDP-D-галактоза + N-ацетилглюкозамин → UDP + D-галактозил-N-ацетил-D-глюкозамин.

Эта реакция у животных является одним из этапов в биосинтезе углеводной части галактозосодержащих гликопротеинов (разд. 11.11). Однако в период лактации D-галактоза в молочной железе играет роль предшественника в другом биосинтетическом процессе, а именно в синтезе *лактозы*, или молочного сахара, который представляет собой дисахарид D-галактозы и D-глюкозы (разд. 11.6). В лактирующей молочной железе галактозилтрансфераза участвует в синтезе лактозы весьма необычным образом. Во время беременности в молочной железе, как и в большей части других тканей, присутствует галактозилтрансфераза, очень активная, если акцептором галактозильных групп служит N-ацетилглюкозамин, и почти совсем неактивная, если роль акцептора играет D-глюкоза. Однако после родов, с началом лактации, специфичность галактозилтрансферазы меняется: теперь она катализирует с очень большой скоростью перенос D-галактозильных групп на D-глюкозу, что приводит к образованию лактозы

UDP-D-галактоза + D-глюкоза → → UDP + D-лактоза.

Этот «новый» фермент называют *лактозосинтазой*.

Изменение специфичности галактозилтрансферазы вызывается образованием особого присутствующего в молоке белка – *α-лактальбумина*. Функция α-лактальбумина долгое время была неизвестной. Теперь выяснилось, что он представляет собой *модификатор фермента*; синтез α-лактальбумина в молочной железе, регулируемый гормонами, вызывающими лактацию, приводит к образованию *лактальбумин-галактозилтрансферазного комплекса*, т.е. *лактозосинтазы*. Таким образом, включение синтеза лактозы в молочной железе под действием гормона происходит в результате образования особой субъединицы лактозосинтазы, изменяющей специфичность фермента.

Краткое содержание главы

Глюконеогенез – это образование «нового» сахара из неуглеводных предшественников, среди которых наибольшее значение имеют пируват, лактат, промежуточные продукты цикла лимонной кислоты и многие аминокислоты. Подобно всем прочим биосинтетическим путям, ферментативный путь глюконеогенеза не идентичен соответствующему катаболическому пути, регулируется независимо от него и требует расхода химической энергии в форме ATP. Синтез глюкозы из пирувата происходит у позвоночных главным образом в печени и отчасти в почках. На этом биосинтетическом пути используются семь ферментов, участвующих в гликолизе; они функционируют обратимо и присутствуют в большом избытке. Однако на гликолитическом пути, т.е. на пути «вниз», имеются также три необратимые стадии, которые не могут использоваться в глюконеогенезе. В этих пунктах глюконеогенез идет в обход гликолитического пути, за счет других реакций, катализируемых другими ферментами. Первый обходный путь – это превращение пирувата в фосфоенолпируват через оксалоацетат; второй – это дефосфорилирование фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемое фруктозодифосфатазой, и, наконец, третий обходный путь – это дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата, катализируемое глюкозо-6-фосфатазой. На каждую молекулу D-глюкозы, образующуюся из пирувата, расходуются концевые фосфатные группы четырех молекул ATP и двух молекул GTP. Регулируется глюконеогенез через две главные стадии: 1) карбоксилирование пирувата, катализируемое пируваткарбоксилазой, которая активируется аллостерическим эффектором ацетил-CoA, и 2) дефосфорилирование фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемое фруктозодифосфатазой, которая ингибируется AMP и активируется цитратом. По три атома углерода от каждо-

го промежуточного продукта цикла лимонной кислоты и углеродные скелеты многих аминокислот способны превращаться в глюкозу. Из жирных кислот с четным числом атомов углерода и из ацетил-СоА реального образования глюкозы не происходит, тогда как три углеродных атома жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, а также образуемый бактериями рубца пропионат могут превращаться в глюкозу; при этом в качестве промежуточного продукта образуется метилмалонил-СоА, превращающийся затем в сукцинил-СоА при участии кофермента B_{12}. В периоды восстановления после напряженной мышечной работы глюконеогенез протекает очень активно, благодаря чему присутствующий в крови лактат превращается в гликоген и глюкозу.

Путь синтеза гликогена также отличается от пути, по которому идет его расщепление. Он включает превращение глюкозо-1-фосфата в уридиндифосфат-глюкозу, которая затем – при участии гликоген-синтазы – передает глюкозильные группы на нередуцирующий конец боковых цепей гликогена. Новые боковые цепи возникают в молекулах гликогена в результате действия гликозил-(4 → 6)-трансферазы [α(1,4 → 1,6)-трансгликозилазы]. Процессы синтеза и расщепления гликогена регулируются независимо и реципрокно. Соотношение скоростей этих двух процессов контролируется гормонами адреналином и глюкагоном. Известен ряд генетических дефектов, при которых синтез или расщепление гликогена нарушены.

Синтез лактозы в молочной железе происходит при участии лактальбумин-галактозилтрансферазного комплекса. Лактальбумин в этом комплексе выполняет роль субъединицы, изменяющей специфичность фермента. Его образование регулируется гормонами, вызывающими лактацию.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Cunningham E. B. Biochemistry: Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, New York, 1978. В гл. 9 содержатся дополнительные сведения, касающиеся биосинтеза углеводов, главным образом энзимологические данные.

Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J. (eds.). Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, vols. I and II, Academic, New York, 1968. Сборник ценных обзоров.

Newsholme E.A., Start C. Regulation in Metabolism, Wiley, New York, 1973. Гл. 4 и 6 включают более подробные данные по регуляции глюконеогенеза и синтеза гликогена.

Статьи

Bent H. A. Energy and Exercise, J. Chem. Ed., vol. 55, nos. 7–12, July-December 1978.

Howell R.R. The Glycogen Storage Diseases, pp. 160–181. In: J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Frederickson (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1978.

Katz J., Rognstad R., Futile Cycles in the Metabolism of Glucose, Curr. Top. Cell Regul., **10**, 238–287 (1976).

Krebs H. A. Some Aspects of the Regulation of Fuel Supply in Omnivorous Animals, Adv. Enz. Regul., **10**, 397–420 (1972).

Sharon N. Carbohydrates, Sci. Am., **243**, 90–116, November 1980.

Вопросы и задачи

1. *Роль окислительного фосфорилирования в глюконеогенезе.* Возможен ли реальный синтез глюкозы из пирувата в условиях, когда цикл лимонной кислоты и окислительное фосфорилирование полностью ингибированы?
2. *Путь атомов углерода в глюконеогенезе.* Печеночный экстракт, способный катализировать все обычные метаболические реакции, инкубируют непродолжительное время в отдельных опытах со следующими двумя предшественниками, меченными ^{14}C:

а) $HO-{}^{14}C(=O)O^-$

^{14}C-бикарбонат

б) $CH_3-C(=O)-{}^{14}C(=O)O^-$

1-^{14}C-пируват

Проследите путь каждого из этих двух предшественников в глюконеогенезе. В каком положении обнаружится метка во всех промежуточных продуктах и в конечном продукте, т.е. в глюкозе?

3. *Путь CO_2 в глюконеогенезе.* В первой обходной реакции глюконеогенеза превращении пирувата в фосфоенолпируват – сначала под действием пируваткарбоксилазы пируват карбоксилируется с образованием оксалоацетата, а затем оксалоацетат декарбоксилируется до фосфоенолпирувата в реакции, катализируемой фосфоенолпируват-карбоксикиназой. Поскольку за присоединением CO_2 непосредственно следует ее отщепление, можно было бы думать, что ^{14}C из $^{14}CO_2$ не будет включаться в фосфоенолпируват и глюкозу, равно как и в любой другой из промежуточных продуктов глюконеогенеза. Выяснилось, однако, что если срезы крысиной печени синтезируют глюкозу в присутствии $^{14}CO_2$, то ^{14}C хотя и не сразу, но все же обнаруживается в фосфоенолпирувате и в конце концов – в 3-м и 4-м углеродных атомах глюкозы. Каким образом метка попадает в фосфоенолпируват и в 3-й и 4-й углеродные атомы глюкозы? (Подсказка: если глюконеогенез происходит в присутствии $^{14}CO_2$, то некоторые четырехуглеродные промежуточные продукты цикла лимонной кислоты тоже оказываются мечеными.)

4. *Регуляция фруктозодифосфатазы и фосфофруктокиназы.* Как влияет повышение концентраций ATP и AMP на каталитическую активность фруктозодифосфатазы и фосфофруктокиназы? Как сказываются эти эффекты на относительной величине потока метаболитов в глюконеогенезе и гликолизе?

5. *Глюкогенные субстраты.* Чтобы определить, может ли то или иное соединение служить предшественником глюкозы, поступают обычно следующим образом: сначала оставляют животное голодать, пока у него не истощится запас гликогена в печени, а потом дают ему исследуемое соединение. Те соединения, под влиянием которых количество гликогена в печени увеличивается, принято называть глюкогенными, потому что они сначала превращаются в глюкозо-6-фосфат. Ниже приведены формулы некоторых соединений. Покажите на основе известных ферментативных реакций, какие из них являются глюкогенными.

а) $^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}COO^{-}$
Сукцинат

б) $CH_2(OH){-}CH(OH){-}CH_2(OH)$
Глицерол

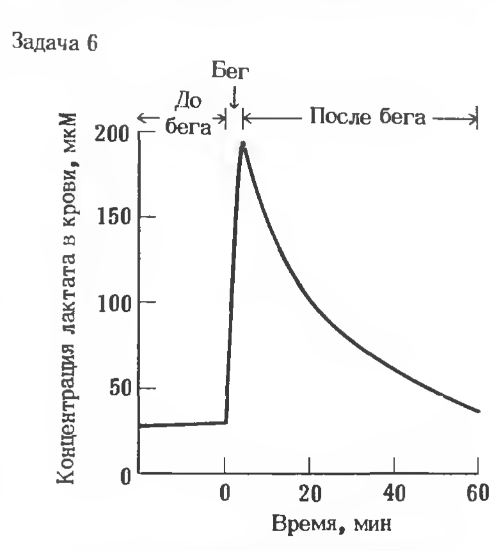
в) $CH_3{-}C({=}O){-}S{-}CoA$
Ацетил-CoA

г) $CH_3{-}C({=}O){-}COO^{-}$
Пируват

д) $CH_3{-}CH_2{-}CH_2{-}COO^{-}$
Бутират

6. *Уровень лактата в крови при большой физической нагрузке.* На рисунке показана концентрация лактата в крови до бега на 400 м, во время бега и после него.

Задача 6



а) Чем вызывается быстрое повышение концентрации лактата?

б) Что является причиной снижения уровня лактата после бега? Почему снижение происходит медленнее, чем подъем?

в) Почему в состоянии покоя концентрация лактата в крови не равна нулю?

7. *Избыточное потребление кислорода во время глюконеогенеза.* Поглощаемый печенью лактат превращается в глюкозу. Этот процесс требует затраты ATP; 6 мо-

лекул ATP расходуются на образование 1 молекулы глюкозы. Об интенсивности этого процесса в срезах крысиной печени можно судить, вводя в среду ^{14}C-лактат и измеряя количество образовавшейся ^{14}C-глюкозы. Поскольку стехиометрические соотношения между потреблением O_2 и синтезом ATP известны (гл. 17), мы можем предсказать, какое дополнительное количество кислорода (сверх обычного уровня) должно быть потреблено при введении данного количества лактата. Фактические измерения показывают, однако, что этот избыток O_2, необходимый для образования глюкозы из лактата, всегда выше предсказанного на основе известных стехиометрических соотношений. Предложите возможное объяснение этого факта.

8. *В какой точке регулируется синтез гликогена?* Объясните, каким образом два приведенных ниже наблюдения могут помочь определить регулируемую стадию синтеза гликогена в скелетных мышцах?
   а) Измеренная активность гликоген-синтазы в покоящейся мышце (выраженная в микромолях UDP-глюкозы, использованной на грамм в минуту) ниже, чем активность фосфоглюкомутазы или UDP-глюкозопирофосфорилазы (выраженная в микромолях субстрата, переработанного на грамм в минуту).
   б) Стимуляция синтеза гликогена вызывает незначительное снижение концентраций глюкозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата, резкое падение концентрации UDP-глюкозы и существенное увеличение концентрации UDP.
9. *Во что обходится организму хранение глюкозы в форме гликогена?* Напишите ряд последовательных реакций и суммарную реакцию, которые позволят определить число молекул ATP, расходуемых на превращение цитоплазматического глюкозо-6-фосфата в гликоген и гликогена обратно в глюкозо-6-фосфат. Какую часть это число составит от максимального числа молекул ATP, образующегося при полном расщеплении глюкозо-6-фосфата?
10. *Выявление дефектных ферментов углеводного обмена.* Проводилось патолого-анатомическое исследование кусочка ткани печени. У больного подозревали генетический дефект одного из ферментов углеводного обмена. Было показано, что гомогенат ткани 1) расщеплял гликоген до глюкозо-6-фосфата, 2) не обладал способностью синтезировать гликоген из какого бы то ни было сахара, так же как и способностью использовать галактозу в качестве источника энергии, и 3) синтезировал глюкозо-6-фосфат из лактата. Ниже названы три фермента; какой из них был дефектным в этом случае:
    а) гликоген-фосфорилаза,
    б) фруктозодифосфатаза,
    в) UDP-глюкозопирофосфорилаза?
    Аргументируйте свой выбор.
11. *Кетоз у овец.* Около 80% всей глюкозы, синтезируемой в организме овцы, используется в вымени. Расходуется глюкоза на образование молока, главным образом на синтез лактозы, а также глицеролфосфата, необходимого для синтеза триацилглицеролов молока. Зимой при низком качестве корма образуется меньше молока и у овец иногда развивается кетоз, т.е. повышается концентрация кетоновых тел в плазме крови. Из-за чего происходят эти изменения? Обычно животным в таких случаях дают большие дозы пропионата. На чем основано его действие?
12. *Адаптация к галактоземии.* Галактоземия – это патологическое состояние, в основе которого лежит неспособность к утилизации галактозы, образующейся из лактозы, содержащейся в пище. Одна из форм этого заболевания обусловлена отсутствием фермента, называемого галактозо-1-фосфат – уридилтрансферазой. Если ребенок с таким дефектом не умирает в раннем возрасте, то позже у него может в какой-то мере развиться способность метаболизировать галактозу. Эта способность появляется за счет усиленного образования фермента UDP-галактозопирофосфорилазы, катализирующего следующую реакцию:

$$\text{UTP} + \text{Галактозо-1-фосфат} \rightarrow \text{UDP-галактоза} + PP_i.$$

Каким образом благодаря присутствию этого фермента у таких больных развивается способность метаболизировать галактозу?

ГЛАВА 21

БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ

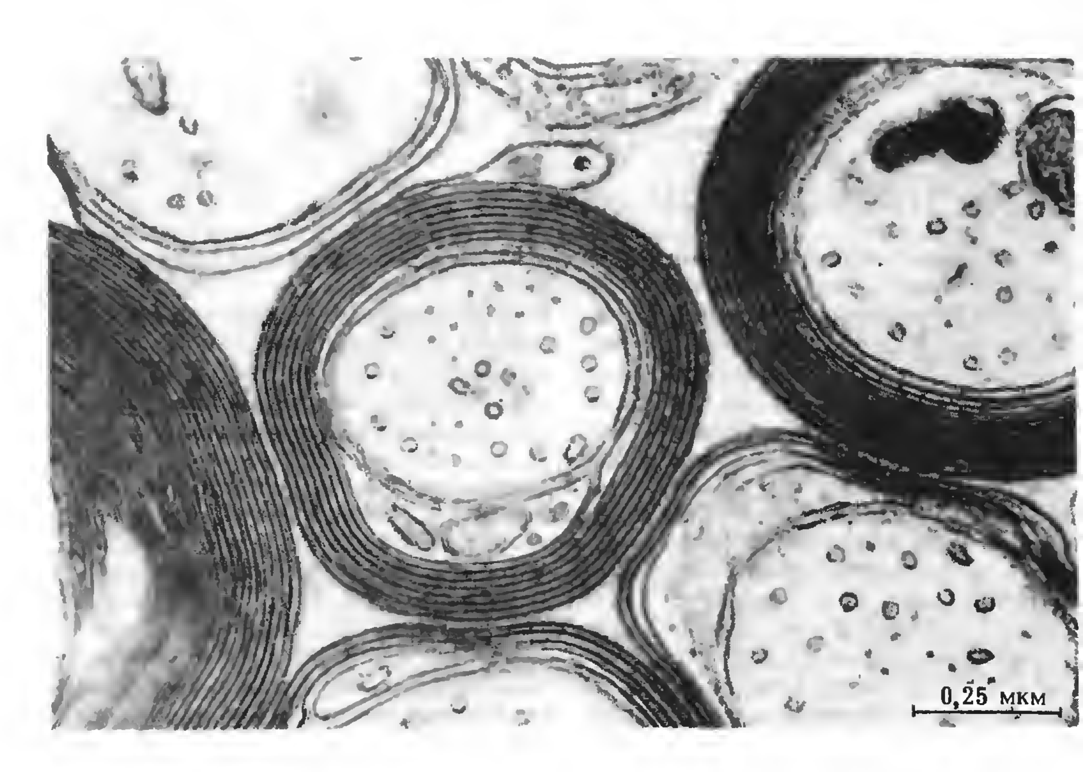
Биосинтез триацилглицеролов у животных представляет собой очень активный метаболический процесс. В значительной степени это обусловлено тем, что животные могут запасать эти соединения в больших количествах. В организме человека (в печени и мышцах) может содержаться лишь несколько сотен граммов гликогена, которых хватает для обеспечения потребности организма в энергии не более чем на 12 часов. На долю же триацилглицеролов в организме мужчины весом 70 кг приходится около 12 кг. Накопленной в них энергии достаточно для поддержания основного обмена человека в течение 8 недель. В тех случаях, когда углеводы потребляются с пищей в избытке и организм уже не способен откладывать их в виде гликогена, они превращаются в триацилглицеролы, которые в больших количествах могут накапливаться в клетках жировой ткани. Больше всего таких клеток находится в подкожной жировой клетчатке и в брюшной полости. Растения также могут запасать энергию в виде высококалорийного топлива – триацилглицеролов; особенно много этих соединений содержится в различных плодах, орехах и семенах.

Полярные липиды мембран, такие, как фосфолипиды и сфинголипиды, в организме животных не запасаются, но они также постоянно синтезируются для восполнения потерь, обусловленных разрушением мембран в ходе метаболических процессов. Например, время полужизни молекул мембранных фосфолипидов в печени крысы составляет менее трех суток.

В этой главе мы сначала рассмотрим биосинтез жирных кислот – основных строительных блоков триацилглицеролов и полярных липидов. Более 90% энергии, запасаемой в триацилглицеролах, приходится на долю жирных кислот. Жирные кислоты придают триацилглицеролам и фосфолипидам характерные для них гидрофобные свойства. Затем мы перейдем к синтезу триацилглицеролов, простейших мембранных фосфолипидов и холестерола – существенного компонента ряда мембран и предшественника таких важных стероидных соединений, как желчные кислоты, половые гормоны и гормоны коры надпочечников.

21.1. Путь биосинтеза жирных кислот отличается от пути их окисления

Прежде всего вспомним, что жирные кислоты в липидах животных тканей имеют в основном четное число атомов углерода. Этот факт уже давно позволил выдвинуть предположение о том, что как окисление, так и синтез жирных кислот осуществляются путем соответственно отщепления и присоединения двухуглеродных фрагментов. После того как выяснилось, что при окислении жирных кислот происходит последовательное окислительное отщепление ацетильных групп в виде ацетил-СоА, естественно было предположить, что биосинтез жирных кислот просто протекает в обратном на-



Поперечный срез, на котором видны миелиновые оболочки аксонов нескольких нервных волокон. Миелиновая оболочка, состоящая главным образом из полярных липидов и некоторых белков, образована плазматической мембраной шванновской клетки. В процессе роста шванновская клетка многократно обертывается вокруг аксона (цитоплазма ее при этом оттесняется к периферии). Образовавшаяся таким путем миелиновая оболочка играет в нервных волокнах роль изолятора и обеспечивает более быстрое проведение нервных импульсов.

правлении с использованием тех же ферментативных реакций, что и при их окислении. Однако оказалось, что биосинтез жирных кислот идет иным путем – с участием других ферментов и в других частях клетки. Более того, было установлено, что биосинтез жирных кислот происходит с образованием трехуглеродных промежуточных продуктов и гребует также присутствия CO_2.

Теперь мы знаем, что *синтазная система для жирных кислот* катализирует суммарную реакцию, в ходе которой одна молекула ацетил-СоА и семь трехуглеродных молекул *малоновой кислоты* в виде тиоэфира *малонил-СоА* (рис. 21-1) последовательно соединяются друг с другом, в результате чего образуется 16-углеродная пальмитиновая кислота и выделяется семь молекул CO_2:

Ацетил-СоА + 7Малонил-S-СоА + + 14NADPH + 20H$^+$ →

$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$ + $7CO_2$ + + 8CoA-SH + 14NADP$^+$ + $6H_2O$.

Следует отметить, что источником восстановительного потенциала, необходимого для создания углеродного скелета жирной кислоты с одинарными связями, служит NADPH. Первая, причем неожиданная, особенность этой реакции состоит в том, что роль непосредственных предшественников семи из восьми двухуглеродных единиц молекулы пальмитиновой кислоты играют трехуглеродные остатки малоновой кислоты. Единственная молекула ацетил-СоА, необходимая для синтеза жирной кислоты, служит «затравкой». Углеродные атомы метильной и карбоксильной групп этой молекулы занимают соответственно 16-е и 15-е положения в образовавшейся молекуле пальмитиновой кислоты (рис. 21-2). Начиная с ацетильного остатка, рост цепи по направлению к карбоксильному концу продолжается путем последовательного присоединения двухуглеродных фрагментов, каждый из которых образуется из малонил-СоА (рис. 21-2). После ацетил-СоА каждый последующий двухуглеродный фрагмент образуется из двух углеродных атомов малонильной группы, находящихся в непосредственной близости от СоА; одновременно с этим освобождается 3-й углеродный атом неэтерифицированной карбоксильной группы с образованием CO_2. Однако в конечном счете *все* углеродные атомы жирных кислот образуются из ацетил-СоА, поскольку, как мы увидим дальше, сам малонил-СоА образуется из ацетил-СоА и двуокиси углерода.

Вторая важная отличительная особенность механизма биосинтеза жирных кислот состоит в том, что промежуточные продукты в этом процессе представляют собой тиоэфиры не СоА, как это имеет место при окислении жирных кислот, а низкомолекулярного *ацилпереносящего белка* (АПБ), у которого есть реакционноспособные —SH-группы.

Третья характерная черта биосинтеза жирных кислот заключается в том, что

COO^-
|
CH_2
|
COO^-
Малонат

$^3COO^-$
|
$^2CH_2$
|
^1C—S—CoA
‖
O
Малонил-СоА

Рис. 21-1. Малонил-СоА – непосредственный предшественник двухуглеродных единиц цепей жирных кислот. Малонил-СоА представляет собой производное малоната – эффективного конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы (разд. 9.13). Поэтому может показаться странным, что именно малонил-СоА служит нормальным предшественником в биосинтезе жирных кислот. Однако малонил-СоА как таковой не ингибирует активность сукцинатдегидрогеназы, возможно, из-за того, что у него нет двух свободных карбоксильных групп, ориентированных в пространстве соответствующим образом и обеспечивающих комплементарное взаимодействие сукцината с центром его связывания в молекуле фермента. Кроме того, свободный малонат не является предшественником малонил-СоА; последний, как мы увидим далее, образуется непосредственно из ацетил-СоА путем его карбоксилирования.

этот процесс протекает в цитозоле эукариотических клеток, тогда как окисление жирных кислот происходит в основном в митохондриях. Синтезированные в цитозоле жирные кислоты, как мы увидим

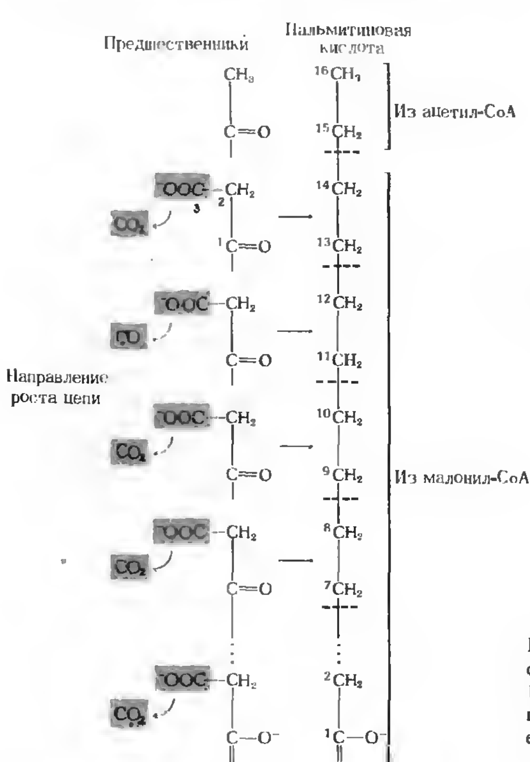


Рис. 21-2. Источник атомов углерода при биосинтезе жирных кислот. В процессе роста цепи 1-й и 2-й углеродные атомы малонильных групп встраиваются в цепь, а 3-й атом выделяется в виде CO_2.

дальше, используются в качестве строительных блоков для синтеза триацилглицеролов или фосфолипидов.

21.2. Малонил-CoA образуется из ацетил-CoA

Непосредственным предшественником большей части двухуглеродных фрагментов в ходе биосинтеза жирных кислот служит малонил-CoA; однако сам он образуется из ацил-CoA в цитозоле. В цитоплазму ацетил-CoA попадает из митохондрий. Давайте последовательно проследим этапы образования малонил-CoA.

Почти весь подвергающийся метаболизму ацетил-CoA образуется в митохондриях в результате окисления пирувата (гл. 16) и жирных кислот (гл. 18), а также при расщеплении углеродных скелетов аминокислот (гл. 19). Однако, как мы уже знаем, (разд. 18.2), митохондриальная мембрана непроницаема для ацетил-CoA. Как же в таком случае митохондриальный ацетил-CoA может служить источником цитоплазматического ацетил-CoA? Эта проблема решается в клетке при помощи *челночного механизма переноса ацильных групп* через митохондриальную мебрану (рис. 21-3). В этой челночной системе внутримитохондриальный ацетил-CoA сначала реагирует с оксалоацетатом, образуя цитрат, т. е. происходит, по существу, первая реакция цикла лимонной кислоты, катализируемая цитрат-синтазой (разд. 16.5).

$$\text{Ацетил-CoA} + \text{Оксалоацетат} + H_2O \rightarrow \text{Цитрат} + \text{CoA} + H^+.$$

Образовавшийся цитрат переносится через внутреннюю мембрану митохондрий из матрикса в цитозоль при помощи спе-

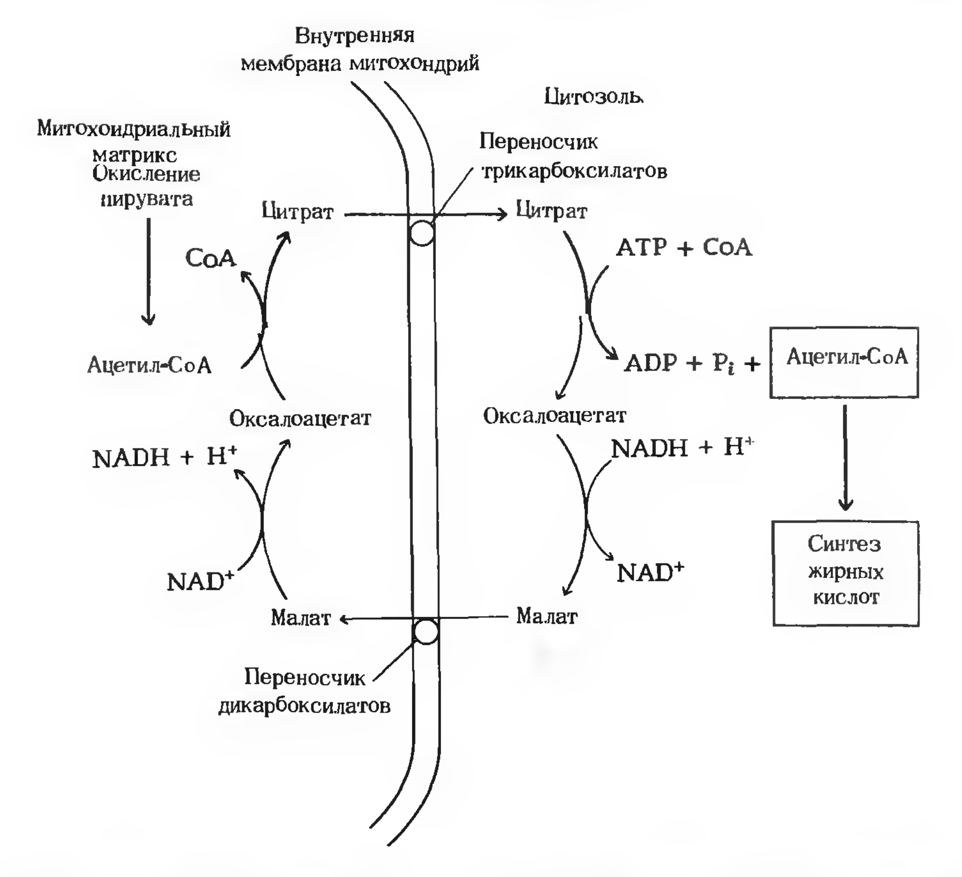


Рис. 21-3. Челночный механизм переноса ацетильных групп из митохондрий в цитозоль, функционирующий в процессе синтеза жирных кислот. Красным цветом выделена последовательность реакций, в ходе которых ацетильные группы в виде цитрата выходят из митохондрий в цитозоль, где используются в форме ацетил-CoA для синтеза жирных кислот. Черные стрелки показывают, каким образом челночный цикл замыкается в результате регенерации митохондриального оксалоацетата.

циальной трикарбоксилат-транспортирующей системы (разд. 17.19). Далее цитрат реагирует с находящимся в цитозоле CoA и ATP, образуя цитозольный ацетил-CoA. Эта реакция катализируется *ATP-цитрат-лиазой* (называемой также *цитратрасщепляющим ферментом*).

$$\text{Цитрат} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Ацетил-CoA} + \text{ADP} + P_i + \text{Оксалоацетат}.$$

Возникший в ходе реакции оксалоацетат как таковой не может попасть обратно внутрь митохондрий. Он восстанавливается под действием цитозольной малатдегидрогеназы до малата, который при помощи дикарбоксилат-транспортирующей системы возвращается в митохондриальный матрикс, где вновь окисляется до оксалоацетата, завершая челночный цикл.

Образовавшийся в цитозоле ацетил-CoA подвергается карбоксилированию, в результате чего образуется малонил-CoA – непосредственный предшественник 14 из 16 углеродных атомов в молекуле пальмитиновой кислоты. Эту необратимую реакцию (рис. 21-4) катализирует *ацетил-CoA—карбоксилаза*:

$$\text{ATP} + \text{Ацетил-CoA} + CO_2 + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Малонил-CoA} + \text{ADP} + P_i + H^+$$

Участвующий в реакции CO_2 образует свободную карбоксильную группу мало-

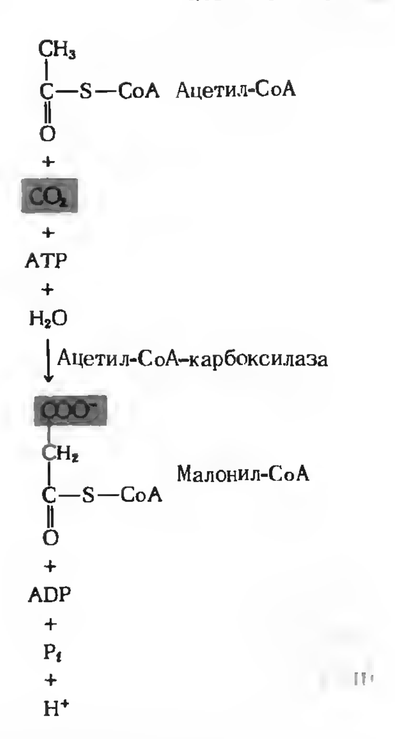


Рис. 21-4. Ацетил-CoA-карбоксилазная реакция. Роль переносчика CO_2 играет биотин, входящий в состав простетической группы фермента. Строение биотина и биоцитина показано на рис. 10-11.

нил-CoA. Ацетил-CoA-карбоксилаза – очень сложный фермент, который в качестве простетической группы содержит *биотин* (разд. 10.9), ковалентно связанный амидной связью с ε-аминогруппой лизинового остатка одной из четырех субъединиц молекулы фермента. Биотиновая группа служит как бы «подвижной рукой», осуществляющей перенос CO_2 на ацетил-CoA:

CO_2 + ATP + H_2O +
+ Биотин—E → Карбоксибиотин—
—E + ADP + P_i + H^+

Карбоксибиотин—E + Ацетил-CoA → Малонил-CoA +
+ Биотин—E

Суммарная реакция:
ATP + Ацетил-CoA + CO_2 +
+ H_2O →
→ Малонил-CoA + ADP + P_i + H^+

Присоединение новой карбоксильной группы к ацетил-CoA и необратимость реакции обеспечиваются за счет энергии ATP.

Ацетил-CoA—карбоксилаза – регуляторный фермент; катализируемая этим ферментом реакция является лимитирующим этапом, определяющим скорость всего процесса биосинтеза жирных кислот в животных тканях. Главным положительным модулятором этого фермента служит цитрат, инициирующий переход фермента в высокоактивный нитевидный полимер. Как только содержание цитрата в митохондриях увеличивается, что наблюдается при высокой скорости образования митохондриального ацетил-CoA и ATP, цитрат выходит из митохондрий и выступает одновременно в роли предшественника цитозольного ацетил-CoA и аллостерического активатора ацетил-CoA—карбоксилазы.

21.3. Синтазная система, катализирующая образование жирных кислот, имеет семь активных центров

В тканях животных семь ферментов, участвующих в биосинтезе жирных кислот, объединены в кластер, или комплекс, получивший название *синтазной системы для жирных кислот*; суммарная молекулярная масса этого комплекса, находящегося в цитоплазме клетки, составляет около 400 000. Объединение семи ферментов понадобилось, вероятно, для того, чтобы ускорить последовательные этапы синтеза жирных кислот.

Центральное место в этой системе занимает *ацилпереносящий белок* (АПБ), с которым ковалентно связываются промежуточные продукты биосинтеза жирных кислот. АПБ – сравнительно небольшой термостабильный белок с молекулярной массой 9 000. Роль простетической группы в АПБ играет *4'-фосфопантетеин* (рис. 21-5), который входит также и в состав кофермента А. В молекуле фосфопантетеина содержатся витамин *пантотеновая кислота* (разд. 10.7) и сульфгидрильная группа. Фосфопантетеин ковалентно связывается через фос-

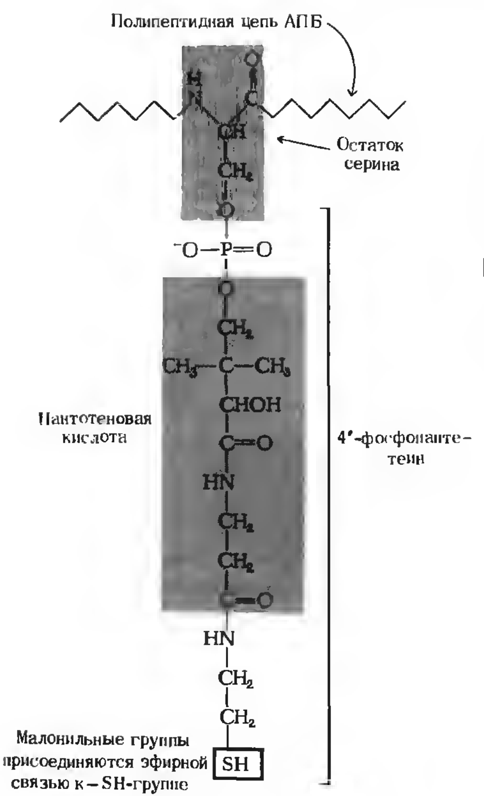
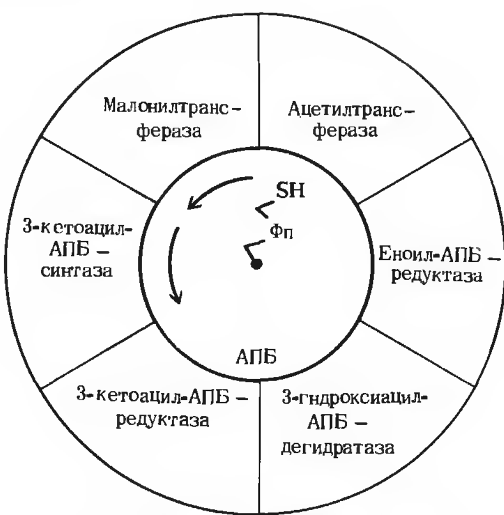


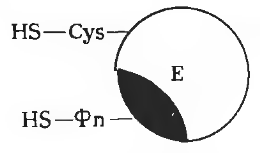
Рис. 21-5. Простетическую группу ацилпереиосящего белка образует 4'-фосфопантетенн, ковалентио связаниый с гндроксильиой группой остатка серина полипептндной цепн. Фосфопаитетеин, в состав которого входит витамии В (паитотеиовая кислота), содержится в молекуле СоА (разд. 10.7). Во время сннтеза жнрных кислот SH-группа фосфопантетеииа служит местом связываиння малонильных групп.



Рнс. 21-6. Схематическое изображеиие синтазного комплекса, катализирующего образоваиие жирных кислот. В животных тканях фермеиты, участвующие в сиитезе жириых кнслот, сгруппированы вокруг ацилпереносящего белка (АПБ). 4'-фосфопантетеиновая простетическая группа (Фп) связаиа с остатком сернна (рис. 21-5). Оиа образует как бы «подвижную руку» (длнной 2,0 им), которая переносит остаткн жириых кнслот от активного центра одиого фермента к актнвному цеитру другого (на схеме против часовой стрелки). В клетках бактерий и растеинй ферменты сиитазиой системы жириых кнслот существуют не в форме кластера, а в виде отдельиых полипептидов.

фатную группу с гидроксильной группой остатка серина в молекуле АПБ.

Функция АПБ в биосинтезе жирных кислот аналогична функции кофермента А в окислении жирных кислот. В процессе построения цепи жирной кислоты промежуточные продукты образуют эфирные связи с АПБ, тогда как при окислении жирных кислот промежуточные продукты образуют эфирные связи с коферментом А. Предполагают, что 4'-фосфопантетеиновая простетическая группа АПБ вместе с остатком серина, к которому она присоединена, служит «подвижной рукой», переносящей в правильной последовательности ковалентно связанные остатки жирных кислот от одного активного центра фермента к другому (рис. 21-6), подобно тому как это имеет место в пируватдегидрогеназном комплексе митохондрий (разд. 16.2). Синтаза жирных кислот содержит существенные для ее активности сульфгидрильные



Рнс. 21-7. В молекуле синтазы жирных кислот имеются две существениые для катализа SH-группы. Одиа SH-группа принадлежит простетической группе 4'-фосфопаитетеина (Фп), а другая – активному остатку цистениа (Cys). Обе —SH-группы участвуют в сиитезе жириых кнслот. Сульфгндрильиая группа фосфопаитетеина в молекуле АПБ служит местом связываиия малоиильиых групп. Буква Е обозиачает весь синтазный комплекс для жнриых кислот.

группы двух типов (рис. 21-7). Одна —SH-группа принадлежит 4-фосфопантетеиновой простетической группе АПБ, а другая – специфическому остатку цистеина в молекуле 3-кетоацил-АПБ—синтазы (разд. 21.5, а). Обе эти —SH-группы участвуют в биосинтезе жирных кислот.

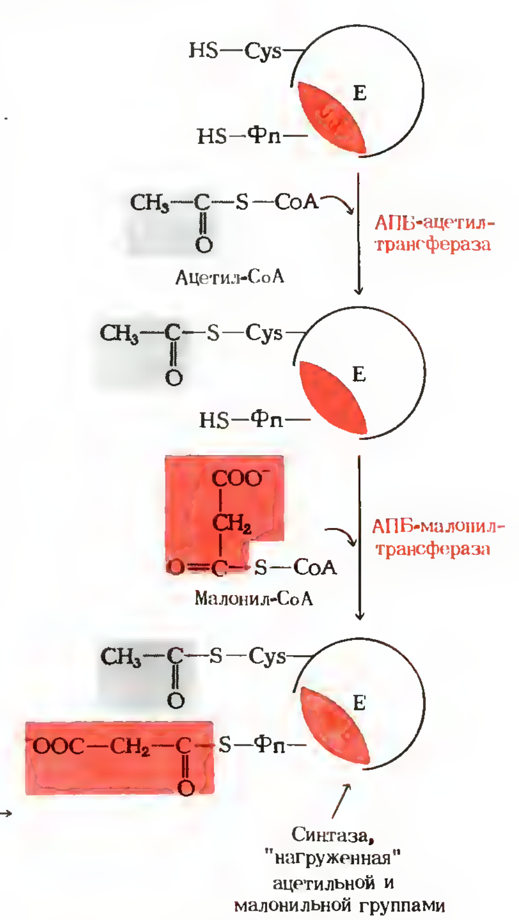


Рис. 21-8. Нагрузка синтазы ацетильной и малонильной группами; первая связывается с —SH-группой цистеина (Cys), а вторая – с —SH-группой 4′-фосфопантетеина (Фп). Вступающие в реакцию малонильные группы всегда присоединяются к SH-группам фосфопантетеина.

21.4. Сульфгидрильные группы синтазы жирных кислот вначале взаимодействуют с ацильными группами

Построение цепи жирной кислоты может начаться лишь после того, как обе сульфгидрильные группы будут «нагружены» соответствующими ацильными группами. Это происходит в результате двух последовательных ферментативных реакций (рис. 21-8). В ходе первой реакции, катализируемой *АПБ-ацетилтрансферазой*, ацетильная группа ацетил-S-CoA переносится на —SH-группу остатка цистеина синтазы (обозначенной буквой E):

Ацетил—S—CoA + (HS—Cys)(HS—АПБ)E ⟶ CoA—SH + (Ацетил—S—Cys)(HS—АПБ)E

В ходе второй реакции малонильная группа малонил-S-CoA переносится на сульфгидрильную группу фосфопантетеина АПБ. Эта реакция катализируется *АПБ-малонилтрансферазой*:

Малонил—S—CoA + (Ацетил—S—Cys)(HS—АПБ)E ⟶ CoA—SH + (Ацетил—S—Cys)(Малонил—S—АПБ)E

Суммарный результат этих двух реакций состоит в том, что с синтазой оказываются ковалентно связанными две ацильные группы: ацетильная группа (присоединившаяся к —SH-группе цистеина) и малонильная (присоединившаяся к SH-

группе фосфопантетеина). Эти две ацильные группы расположены в молекуле фермента довольно близко друг от друга. Теперь синтаза готова к процессу наращивания цепи жирной кислоты. Важно запомнить, что малонильная группа связывается только с —SH-группой пантетеина.

21.5. Присоединение каждого двухуглеродного фрагмента происходит в четыре этапа

а. Конденсация

На первом из четырех этапов удлинения углеродной цепи жирной кислоты ацетильная и малонильная группы, ковалентно связанные с —SH-группами синтазы, подвергаются конденсации с образованием ацетоацетильной группы, ковалентно связанной с —SH-группой фосфопантетеина: одновременно с этим происходит выделение молекулы CO_2. Эту реакцию катализирует *3-кетоацил-АПБ—синтаза*:

$$\begin{matrix} \text{Ацетил—S—Cys} \\ \text{Малонил—S—ACP} \end{matrix} \Big\rangle E + H^+ \longrightarrow \begin{matrix} \text{HS—Cys} \\ \text{Ацетоацетил—S—ACP} \end{matrix} \Big\rangle E + CO_2$$

Обратите внимание на то, что ацетильная группа переносится с —SH-группы цистеина на малонильную группу, которая связана с —SH-группой фосфопантетеина; таким образом, она становится концевым двухуглеродным звеном вновь образованной ацетоацетильной группы (рис. 21-9). При этом ацетильная группа вытесняет свободную карбоксильную группу остатка малоната в виде CO_2. В ходе этой реакции образуется та самая CO_2, которая исходно включилась в молекулу малонил-СоА путем описанной выше ацетил-СоА-карбоксилазной реакции. Таким образом, в ходе биосинтеза жирной кислоты двуокись углерода не используется для построения ковалентного остова молекулы жирной кислоты,

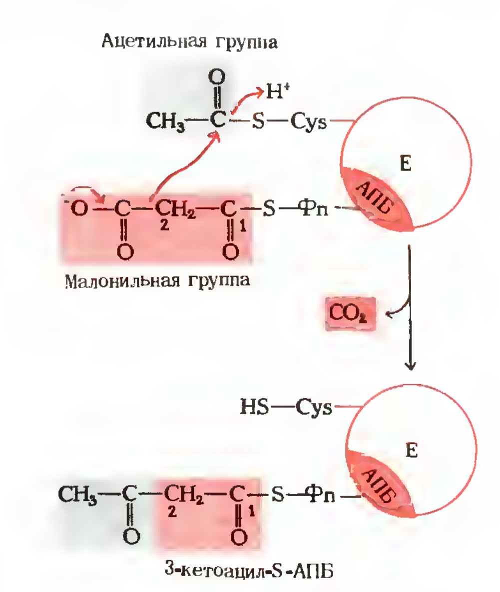


Рис. 21-9. Реакция конденсации в биосинтезе жирных кислот. Отщепление CO_2 от малонильной группы (показана красным цветом) создает движущую силу для переноса ацетильной группы (на сером фоне) от Cys—SH на 2-й углеродный атом малонильной группы. Исходная ацетильная группа по завершении синтеза жирной кислоты становится последней двухуглеродной единицей метильного конца молекулы жирной кислоты.

а играет роль *катализатора*, поскольку каждый раз при присоединении новой двухуглеродной единицы она регенирирует, отщепляясь от растущей цепи жирной кислоты.

Зачем клеткам понадобилось создавать малонильную группу из ацетильной, присоединяя CO_2, которая затем вновь отщепляется при образовании ацетоацетата? Ответ на этот вопрос заключается в том, что при отщеплении CO_2 от малонильной группы резко возрастает реакционная способность оставшегося двухуглеродного фрагмента и благодаря этому он может быстро взаимодействовать с ацетильной группой (рис. 21-9).

б. 3-кетовосстановление

Ацетоацетил-S-АПБ подвергается далее восстановлению по карбонильной группе с образованием D-3-гидроксибутирил-S-АПБ. В этой реакции, катилизируемой *3-кетоацил-АПБ—редуктазой*,

в качестве донора электронов используется NADPH (рис. 21-10).

$$\begin{matrix}\text{HS—Cys} \\ \text{Ацетоацетил—S—АПБ}\end{matrix}\Big\rangle E + NADPH + H^+ \longrightarrow \begin{matrix}\text{HS—Cys} \\ \text{D-3-гидроксибутирил—S—АПБ}\end{matrix}\Big\rangle E + NADP^+$$

Отметим, что D-3-гидроксибутирильная группа стерически не идентична L-3-гидроксиацильной группе промежуточного продукта, образующегося при окислении жирных кислот (разд. 18.4, б).

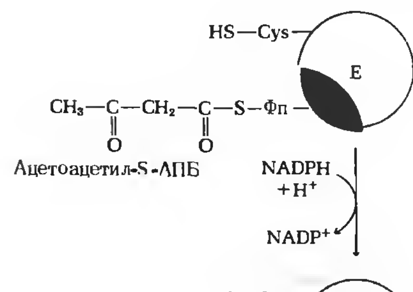
в. Дегидратация

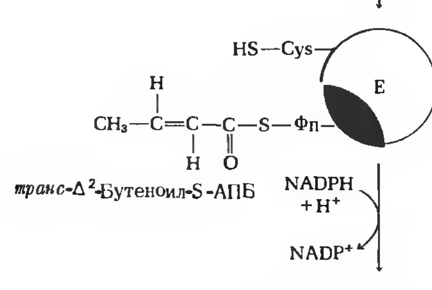
В ходе третьего этапа цикла синтеза жирной кислоты D-3-гидроксибутирил-S-АПБ дегидратируется под действием *3-гидроксиацил-АПБ—дегидратазы* с образованием *транс*-Δ^2-бутеноил-S-АПБ (рис. 21-10).

$$\begin{matrix}\text{HS—Cys} \\ \text{D-3-гидроксибутирил—S—АПБ}\end{matrix}\Big\rangle E \longrightarrow \begin{matrix}\text{HS—Cys} \\ \textit{транс}\text{-}\Delta^2\text{-бутеноил—S—АПБ}\end{matrix}\Big\rangle E + H_2O$$

г. Насыщение

На четвертом этапе, завершающем один цикл реакций, осуществляемых синтазным комплексом для жирных кислот, двойная связь *транс*-Δ^2-бутеноил-S-АПБ восстанавливается, или насыщается, под действием *еноил-АПБ—редуктазы* с образованием *бутирил-S-АПБ*





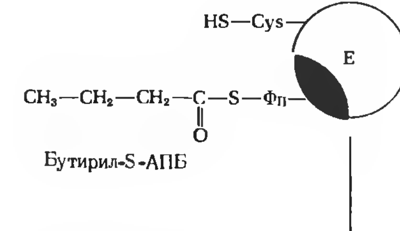


Рис. 21-10. Три последовательных этапа цикла синтеза жирной кислоты. По окончании последней реакции бутирильная группа переносится на —SH-группу цистеина. После этого Фп—SH-группа опять готова соединиться со следующей вступающей в реакцию малонильной группой малонил-СоА.

(рис. 21-10). Роль донора электронов в этой реакции вновь играет NADPH.

HS—Cys

E + NADPH + H^+ ⟶

транс-Δ^2-Бутеноил —S—АПБ

HS—Cys

E + $NADP^+$

Бутирил—S—АПБ

Бутирильная группа после этого переносится с —SH-группы фосфопантетеина на —SH-группу цистеина.

HS—Cys / E / Бутирил—S—АПБ ⟶ Бутирил—S—Cys / E / HS—АПБ

Вновь образованная удлиненная ацильная группа занимает теперь положение при той —SH-группе, с которой исходно была связана ацетильная группа.

Новый цикл реакций, приводящих к удлинению цепи еще на одно двухуглеродное звено, начинается с переноса следующей малонильной группы с малонил-CoA на —SH-группу фосфопантетеина АПБ (рис. 21-11). Далее бутирильная группа покидает —SH-группу цистеина и замещает CO_2 в малонильной группе на HS—АПБ. В результате получается шестиуглеродная ацильная группа, ковалентно связанная с —SH-группой фосфопантетеина. В ходе трех следующих этапов синтазного цикла 3-кетогруппа образовавшейся ацильной группы восстанавливается и образуется шестиуглеродная насыщенная ацильная группа подобно тому, как это происходит в предыдущем цикле реакций. Далее гексаноильная группа переносится с —SH-группы фосфопантетеина на —SH-группу цистеина.

После семи таких циклов образуется конечный продукт – пальмитоил—S-АПБ. Процесс наращивания цепи закан-

Рис. 21-11. Начало второго оборота цикла синтеза жирной кислоты. Бутирильная группа связана с —SH-группой цистеина. Вступающая в реакцию малонильная группа связывается с Фп—SH-группой. На этапе конденсации бутирильная группа, соединенная с Cys—SH-группой, обменивается на свободную карбоксильную группу малонильного остатка, которая при этом отщепляется в виде CO_2 (на красном фоне). В образовавшемся продукте – шестиуглеродной 3-кетоацильной группе – четыре атома углерода происходят из малонил-CoA, а остальные два – из ацетил-CoA, с которого начиналась реакция.

чивается на 16-м углеродном атоме, после чего под действием гидролитического фермента молекула пальмитиновой кислоты отщепляется от молекулы АПБ.

$$\begin{matrix} HS\text{—}Cys \searrow \\ E \\ \text{Пальмитоил—}S\text{—АПБ} \nearrow \end{matrix} + H_2O \longrightarrow \text{Пальмитиновая кислота} + \begin{matrix} HS\text{—}Cys \searrow \\ E \\ HS\text{—АПБ} \nearrow \end{matrix}$$

Отметим, что для синтеза пальмитиновой кислоты необходимы два вида химической энергии – энергия фосфатной группы ATP и восстановительный потенциал NADPH. ATP нужен для образования тиоэфирной связи в ацетил-СоА и построения малонил-СоА путем присоединения CO_2 к ацетил-СоА, тогда как NADP используется для восстановления двойных связей.

NADPH, который необходим для восстановительных реакций, протекающих в ходе биосинтеза жирной кислоты, в разных клетках поступает из двух различных источников. В печени NADPH образуется главным образом в реакциях пентозофосфатного пути (разд. 16.13), в основном под действием *глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы*

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + NADP^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{6-фосфоглюконат} + NADPH + H^+.$$

В жировых клетках (адипоцитах) NADPH образуется преимущественно в результате действия малат-дегидрогеназы

$$\text{Малат} + NADP^+ \rightarrow \text{Пируват} + CO_2 + NADPH + H^+.$$

Обе эти реакции, приводящие к образованию NADPH, протекают в цитозоле, в котором молярное отношение $NADPH/NADP^+$ очень велико (около 75), что обеспечивает высокий восстановительный потенциал, необходимый для синтеза жирных кислот. Напротив, молярное отношение $NADH/NAD^+$ в цитозоле значительно меньше (оно составляет приблизительно $8 \cdot 10^{-4}$). NADPH в цитозоле прекрасно приспособлен для роли первичного донора водородных атомов, используемых в ходе восстановительных биосинтетических реакций.

Суммируя все изложенное выше, можно сказать, что ферментативный биосинтез пальмитиновой кислоты отличается от ее ферментативного окисления 1) внутриклеточной локализацией; 2) природой переносчика ацильных групп; 3) формой, в которой двухуглеродные единицы присоединяются к цепи жирной кислоты или отщепляются от нее; 4) стереоконфигурацией промежуточного β-гидроксиацильного соединения; 5) типом пиридинового нуклеотида, используемого в восстановительных реакциях, и 6) участием CO_2. Перечисленные различия (табл. 21-1) показывают, что эти два противоположно направленных процесса характеризуются разными физическими и химическими параметрами.

Таблица 21-1. Различия между ферментативным биосинтезом и ферментативным окислением пальмитиновой кислоты

	Биосинтез	Окисление
Внутриклеточная локализация	Цитозоль	Митохондрии
Переносчик ацильных групп	АПБ	СоА
Форма, в которой двухуглеродные фрагменты участвуют в реакции	Малонил-СоА	Ацетил-СоА
Стереоизомерная форма 3-гидроксиацильной группы	D	L
Донор или акцептор электронов	NADPH	FAD, NAD^+
Участие CO_2	Да	Нет

21.6. Пальмитиновая кислота служит предшественником других длинноцепочечных жирных кислот

В животных клетках пальмитиновая кислота, обычный продукт, образующийся в синтазном цикле жирных кислот, служит предшественником других длинноцепочечных жирных кислот (рис. 21-12). При помощи ферментных систем, катализирующих удлинение цепей жирных кислот, она может удлиняться путем присоединения ацетильных групп, приводящего к образованию *стеариновой кислоты* (18 атомов углерода) или более длинных насыщенных жирных кислот; этот процесс протекает в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Система удлинения цепи в эндоплазматическом ретикулуме, обладающая более высокой активностью, действует точно так же, как при синтезе пальмитата: стеароил-АПБ образуется из пальмитоил-АПБ путем присоединения двухуглеродных фрагментов, донором которых служит малонил-СоА.

Пальмитиновая и стеариновая кислоты являются предшественниками двух наиболее распространенных в животных тканях мононенасыщенных жирных кислот (рис. 21-12): *пальмитолеиновой* (16 атомов углерода) и *олеиновой* (18 атомов углерода), каждая из которых содержит одну *цис*-двойную связь в Δ^9-положении (разд. 12.1). Образование двойной связи в молекуле жирной кислоты происходит в результате реакции окисления, катализируемой *ацил-СоА—оксигеназой*

$$\text{Пальмитоил-CoA} + \text{NADPH} + H^+ + O_2 \rightarrow \text{Пальмитолеил-CoA} + \text{NADP}^+ + 2H_2O,$$

$$\text{Стеароил-CoA} + \text{NADPH} + H^+ + O_2 \rightarrow \text{Олеил-CoA} + \text{NADP}^+ + 2H_2O.$$

Эти реакции могут служить примерами реакций окисления, катализируемых оксигеназами со смешанной функцией, поскольку в них одновременно окисляются

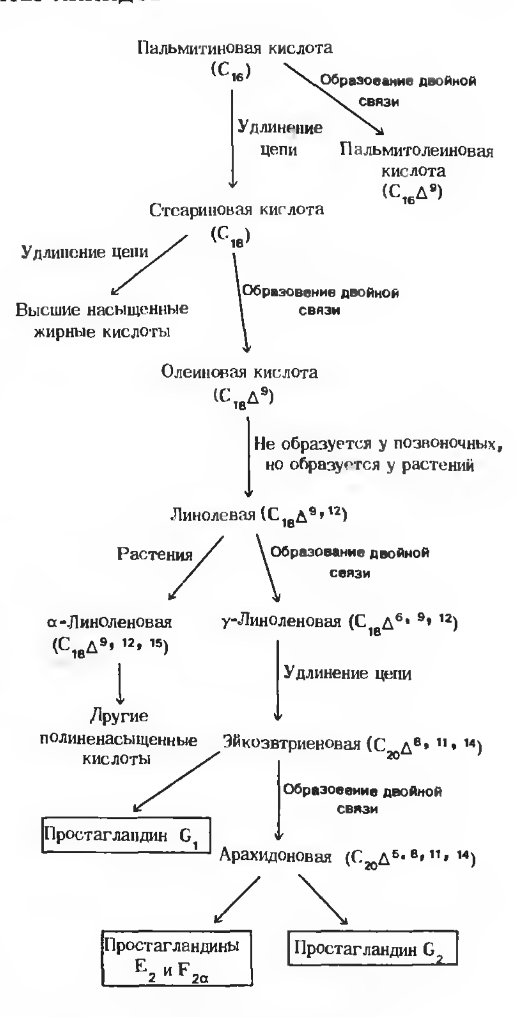


Рис. 21-12. Пути синтеза жирных кислот. Пальмитиновая кислота служит предшественником стеариновой кислоты и других длинноцепочечных насыщенных жирных кислот, а также мононенасыщенных кислот – пальмитолеиновой и олеиновой. В организме животных олеиновая кислота не может превращаться в линолевую, поэтому линолевая кислота является для них незаменимой жирной кислотой, которая обязательно должна содержаться в пище. На рисунке показано превращение линолевой кислоты в другие полиненасыщенные жирные кислоты и простагландины. В обозначениях ненасыщенных жирных кислот указывают число углеродных атомов, а также число и положение двойных связей. Так, линолевая кислота ($C_{18}\Delta^{9,12}$) содержит 18 атомов углерода и две двойные связи: одну между 9-м и 10-м атомами углерода и одну между 12-м и 13-м.

две разные группы: одинарная связь жирной кислоты и NADPH.

В животных тканях двойная связь в Δ^9-положении молекулы жирной кислоты образуется легко, тогда как образование дополнительной двойной связи между Δ^9-двойной связью и метильным концом жирной кислоты невозможно. Млекопитающие не могут синтезировать *линолевую кислоту* (с двумя двойными связями в Δ^9- и Δ^{12}-положениях) и *α-линоленовую* ($C_{18}\Delta^{9,12,15}$). Поскольку эти жирные кислоты используются в качестве предшественников в синтезе других продуктов, они должны обязательно поступать в пищу животных из растений. Эти кислоты называются поэтому *незаменимыми жирными кислотами*. Недостаток в пище линолевой кислоты вызывает у крыс чешуйчатый дерматит. Поступившая в организм млекопитающих линолевая кислота служит единственным предшественником других полиненасыщенных кислот, таких как *γ-линоленовая* и *арахидоновая* кислоты (разд. 12.1); (рис. 21-12). Арахидоновая кислота содержит 20 атомов углерода и четыре двойные связи в положениях Δ^5, Δ^8, Δ^{11} и Δ^{14}. Эта кислота имеет чрезвычайно важное значение, так как служит незаменимым предшественником большинства *простагландинов* и *тромбоксанов* – гормоноподобных веществ, регулирующих разнообразные клеточные функции (гл. 25).

21.7. Регуляция биосинтеза жирных кислот

Скорость биосинтеза жирных кислот определяется главным образом скоростью ацетил-СоА-карбоксилазной реакции, в результате которой образуется малонил-СоА. Ацетил-СоА—карбоксилаза – это аллостерический фермент, который в отсутствие цитрата, играющего роль активирующего модулятора, проявляет очень низкую активность. Повышение концентрации цитрата в митохондриях приводит к тому, что при помощи челночного механизма он начинает поступать в цитозоль. Появление цитрата в цитозоле служит аллостерическим сигналом, означающим, что цикл лимонной кислоты перегружен «топливом» и что избыток ацетил-СоА должен запасаться в виде жира. Связываясь с аллостерическим участком ацетил-СоА—карбоксилазы, цитрат значительно ускоряет превращение ацетил-СоА в малонил-СоА. В цитозоле цитрат используется также как источник ацетил-СоА, который необходим для синтеза жирных кислот. В том случае, когда пальмитоил-СоА (продукт синтеза жирных кислот и непосредственный предшественник триацилглицеролов) образуется в избыточных количествах, он играет роль аллостерического ингибитора ацетил-СоА—карбоксилазы. Поскольку жирные кислоты запасаются не в свободном виде, а в форме триацилглицеролов, концентрация глицеролфосфата (одного из предшественников триацилглицеролов) может оказывать регулирующее влияние на синтез жирных кислот. Другие факторы, о которых речь пойдет дальше, координируют биосинтез жирных кислот с обменом углеводов.

Давайте теперь рассмотрим, каким образом из жирных кислот и глицерола синтезируются триацилглицеролы.

21.8. Биосинтез триацилглицеролов и глицеролфосфатидов начинается с общих предшественников

В животных тканях биосинтез *триацилглицеролов* и главных фосфолипидов – *фосфатидилэтаноламина* и *фосфатидилхолина* начинается с двух общих предшественников и имеет несколько общих этапов. Общими предшественниками служат *СоА-эфиры жирных кислот* и *глицерол-3-фосфат*. Глицеролфосфат может образовываться двумя путями. В ходе гликолиза он возникает из дигидроксиацетонфосфата под действием цитоплазматического NAD-зависимого фермента *глицеролфосфатдегидрогеназы*:

$$\text{Дигидроксиацетонфосфат} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-глицерол-3-фосфат} + \text{NAD}^+.$$

Кроме того, глицеролфосфат может образоваться из глицерола под действием *глицеролкиназы* (разд. 14.13):

ATP + Глицерол →
→ Глицерол-3-фосфат + ADP.

Другими предшественниками триацилглицеролов служат CoA-производные жирных кислот, образующиеся при помощи *ацил-CoA—синтетаз* (разд. 18.2)

Жирная кислота + ATP +
+ CoA—SH → Ацил—S—CoA +
+ AMP + PP_i

На первом этапе биосинтеза триацилглицеролов происходит ацилирование двух свободных гидроксильных групп глицеролфосфата двумя молекулами CoA-производных жирных кислот с образованием диацилглицерол-3-фосфата (рис. 21-13):

Ацил—S—CoA + Глицерол →
→ Моноацилглицерол-3-фосфат +
+ CoA—SH

Моноацилглицерол-3-фосфат +
+ Ацил—S—CoA →
→ Диацилглицерол-3-фосфат +
+ CoA—SH

Диацилглицерол-3-фосфат (чаще его называют *фосфатидной кислотой*) встречается в клетках лишь в следовых количествах, однако он является важным промежуточным продуктом в биосинтезе липидов. В ходе синтеза триацилглицеролов фосфатидат гидролизуется *фосфатидат-фосфатазой* с образованием *1,2-диацилглицерола* (рис. 21-13):

Фосфатидат + H_2O →
→ 1,2-диацилглицерол + P_i.

Диацилглицерол, взаимодействуя с третьей молекулой CoA-производного жирной кислоты, превращается затем в триацилглицерол:

CoA-производное жирной кислоты +
+ 1,2-диацилглицерол →
→ Триацилглицерол + CoA—SH.

Формирование каждой эфирной связи триацилглицеролов требует значительного количества свободной энергии. Для того чтобы возникла эфирная связь, жирная кислота сначала должна активироваться путем образования эфира с CoA; для этой реакции необходима энергия двух высокоэнергетических фосфатных связей, так как она протекает благодаря пирофосфатному расщеплению ATP и последующему гидролизу образовавшегося пирофосфата.

Глицеролфосфат
R—C(=O)—S—CoA
Глицеролфосфат-ацилтрансфераза
2 CoA—SH
L-фосфатидат
H_2O
Фосфатидат-фосфатаза
P_i
Диацилглицерол

Рис. 21-13. Синтез диацилглицеролов. Два остатка жирных кислот вступают в реакцию последовательно. Как правило, в положения R_1 и R_2 включаются два разных остатка длинноцепочечных жирных кислот. Следует помнить, что в молекуле диацилглицеролфосфата длина жирнокислотных остатков значительно превышает размеры молекулы глицеролфосфата (разд. 12.2)

21.9. Биосинтез триацилглицеролов регулируется гормонами

В норме у взрослых людей и у животных биосинтез и окисление триацилглицеролов протекают одновременно, и для этих процессов устанавливается определенное стационарное состояние, так что количество жира в организме сохраняется в течение сравнительно длительного времени на относительно постоянном уровне, хотя, конечно, при изменении калорийности пищевого рациона могут возникать незначительные временные отклонения. Однако в тех случаях, когда углеводы, жиры или белки употребляются в количествах, превосходящих энергетические потребности организма, излишки калорий запасаются в виде триацилглицеролов. Источником ацетил-СоА, необходимого для реального биосинтеза жирных кислот и триацилглицеролов, могут служить как углеводы (гл. 16), так и углеродные цепи аминокислот (гл. 18). Накопленный таким образом избыток жира может быть использован для получения энергии, что позволяет организму приспособляться к голоданию (гл. 26).

Скорость биосинтеза триацилглицеролов радикально меняется под действием ряда гормонов. Инсулин, например, стимулирует превращение углеводов в триацилглицеролы. При тяжелых формах диабета в результате нарушения секреции или действия инсулина у больных утрачивается способность не только правильно усваивать глюкозу, но и синтезировать жирные кислоты и триацилглицеролы из углеводов или аминокислот. Вследствие этого у них увеличивается скорость окисления жиров и образования кетоновых тел; в результате происходит потеря веса. На обмен триацилглицеролов оказывает также влияние секреция гипофизарного гормона роста, гормонов коры надпочечников и глюкагона (гл. 25).

21.10. Триацилглицеролы — источник энергии для некоторых впадающих в спячку животных

Многие животные во время зимней спячки, в периоды миграций, а также в других ситуациях, требующих радикальных приспособительных изменений обмена веществ, используют в качестве источника энергии запасенный в организме жир. Верблюды, например, могут даже использовать воду, образующуюся при окислении жиров.

Одним из наиболее ярких и хорошо известных примеров приспособления жирового обмена у животных к неблагоприятным условиям существования может служить зимняя спячка медведей гризли. Зимний сон этих медведей длится, не прерываясь, в течение 7 месяцев. В отличие от других впадающих в спячку животных у гризли температура тела во время сна поддерживается между 32 и 35°С, т. е. почти на нормальном уровне. Несмотря на то что в таком состоянии медведь расходует около 6000 калорий в день, он в течение нескольких месяцев ничего не ест, не пьет и не выделяет ни мочи, ни кала. При внезапном пробуждении гризли практически сразу же приходит в возбужденное состояние и готов к самообороне.

Экспериментальные исследования показали, что запасенный в организме медведя жир служит для него единственным источником энергии во время спячки. Образующейся при окислении жиров энергии хватает на поддержание температуры тела, активный синтез аминокислот и белков, а также на другие требующие энергии процессы, такие, как транспорт веществ через мембраны. Большие количества воды, выделяющейся при окислении жиров (разд. 18.6), компенсируют потерю воды в процессе дыхания. Кроме того, при расщеплении триацилглицеролов образуется глицерол, который затем превращается в глюкозу путем его ферментативного фосфорилирования с образованием глицеролфосфата и окисления последнего до дигидроксиацетонфосфата. Образующаяся в ходе расщепления аминокислот мочевина ре-

абсорбируется в организме медведя и вновь используется для синтеза аминокислот, необходимых для построения новых белков.

При подготовке к длительным периодам спячки гризли запасают огромное количество жира. Поздней весной и летом взрослое животное потребляет обычно около 9000 ккал в день. Однако, когда приближается зима и происходят сезонные изменения гормональной секреции, медведи начинают кормиться по 20 ч в день и потребляют при этом до 20 000 ккал. Углеводы, поглощаемые ими в этот период в огромных количествах, перерабатываются в триацилглицеролы. Другие впадающие в спячку животные, к которым, в частности, относятся мелкие грызуны сони, тоже накапливают большие запасы жира (рис. 21-14). Верблюд, хотя и не впадает в спячку, может синтезировать и запасать в своем горбу большие количества триацилглицеролов, которые в условиях пустыни служат ему одновременно источником воды и энергии.

Запасы триацилглицеролов могут быть использованы и для других важных биологических целей. Вы уже знаете, что арктические моржи и тюлени используют толстый подкожный слой триацилглицеролов для теплоизоляции (разд. 12.3). Совсем другую функцию выполняют триацилглицеролы, содержащиеся в особом мешке в голове кашалота (дополнение 21-1).



Рис. 21-14. Хорошо упитанная соня непосредственно перед зимней спячкой. Впадающие в спячку животные запасают большие количества жира, который служит не только источником энергии, но и защищает их от холода. Во время спячки соня сворачивается в клубочек, что обеспечивает минимальное отношение поверхности тела к его объему и сводит к минимуму потерю тепла.

Дополнение 21-1. Еще одна биологическая функция триацилглицеролов

Проведенные в последнее время исследования анатомии кашалотов и их пищевого поведения позволили выявить еще одну биологическую функцию триацилглицеролов. Длина тела кашалотов достигает в среднем почти 20 м. При этом голова кашалота, имеющая огромные размеры, составляет около одной четверти общей длины животного и свыше одной трети его общего веса (рис. 1). Около 90% веса головы приходится на *спермацетовый мешок*, расположенный над длинной верхней челюстью. Он представляет собой жировую подушку, состоящую из жировой соединительной ткани с включенными в нее мышцами. В этой жировой подушке содержится до 4 т спермацета – смеси триацилглицеролов, содержащих в основном ненасыщенные жирные кислоты. При нормальной температуре тела кашалота, находящегося в состоянии покоя (около 37°С), спермацет имеет жидкую консистен-

цию, однако при 31°C он начинает кристаллизоваться, а когда температура снижается еще на несколько градусов, становится твердым.

Биологическая функция спермацета в течение длительного времени оставалась загадкой. Лишь в последнее время благодаря изучению анатомии и пищевого поведения кашалота возникло правдоподобное объяснение функции спермацета. Кашалоты питаются почти исключительно кальмарами, за которыми охотятся на очень большой глубине. Ныряя за добычей, кашалоты могут находиться под водой около 50 мин, а затем, всплывая на поверхность, они успевают всего лишь за 10 мин восполнить запасы кислорода и избавиться от CO_2. В поисках пищи кашалоты могут нырять на глубину 1000 м и более (рекорд составляет около 3000 м). На такой глубине, где водится множество кальмаров, кашалоты не имеют конкурентов в борьбе за добычу.

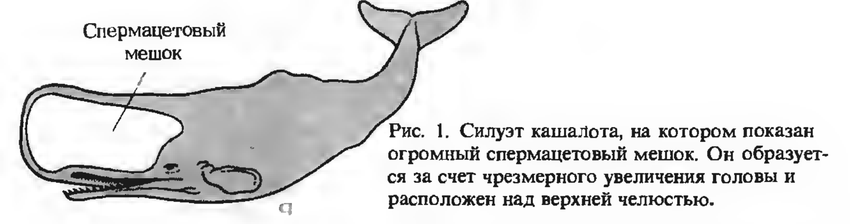


Рис. 1. Силуэт кашалота, на котором показан огромный спермацетовый мешок. Он образуется за счет чрезмерного увеличения головы и расположен над верхней челюстью.

При погружении в воду кашалот тратит на охоту за кальмарами лишь около 25% всего времени его пребывания под водой; остальное же время он спокойно отдыхает на большой глубине, ожидая, пока появится стая кальмаров, на которую можно будет напасть. Теперь мы вновь вернемся к спермацету. Чтобы морское животное могло оставаться на нужной глубине, его тело должно иметь ту же плотность, что и окружающая вода. Для этого у некоторых видов морских животных имеется заполненный воздухом или азотом плавательный пузырь; другие же виды используют запасы жира, плотность которого меньше плотности морской воды. Однако кашалоты способны изменять свою плавучесть, приспосабливаясь к плотности воды не только на поверхности тропических вод, но и на большой глубине, где вода значительно холоднее и, следовательно, имеет более высокую плотность. Ключом к пониманию того, каким образом кашалотам удается изменять свою плавучесть, служит точка замерзания спермацета. При понижении температуры жидкого спермацета на несколько градусов во время глубокого погружения он кристаллизуется и становится более плотным, в результате чего плавучесть кашалота изменяется в соответствии с более высокой плотностью морской воды на большой глубине. Чтобы во время ныряния жир мог быстро охлаждаться, спермацетовый мешок снабжен многочисленными капиллярами. Теплоотдача, обусловленная быстрой циркуляцией крови, ускоряется также благодаря тому, что кашалот пропускает воду через спермацетовый мешок, который может закрываться и заполняться более холодной водой во время погружения. Когда животное всплывает, спермацет вновь нагревается и плавится, что приводит к уменьшению его плотности и обеспечивает кашалоту необходимую на поверхности воды плавучесть.

Описанная особенность кашалотов служит замечательным примером развившейся в ходе эволюции анатомической и биохимической адаптации. Синтезируемые кашалотом триацилглицеролы содержат

жирные кислоты, длина цепей которых и степень ненасыщенности обеспечивают нужную температуру плавления спермацета. Благодаря этому животное, не прибегая к дополнительным усилиям, может кормиться на больших глубинах, затрачивая при этом минимум энергии.

21.11. Для биосинтеза фосфоглицеролов нужны группы, образующие головы молекул

Теперь мы приступим к рассмотрению синтеза мембранных липидов. Фосфоглицеролы *фосфатидилэтаноламин* и *фосфатидилхолин* – основные компоненты мембранных липидов – также синтезируются из 1,2-диацилглицеролов. Последовательность этих реакций приведена на рис. 21-15. В процессе формирования фосфоглицеролов к их молекулам присоединяются специфические «головы» (разд. 12.5) в результате еще не рассмотренной нами промежуточной ферментативной реакции. В ходе синтеза

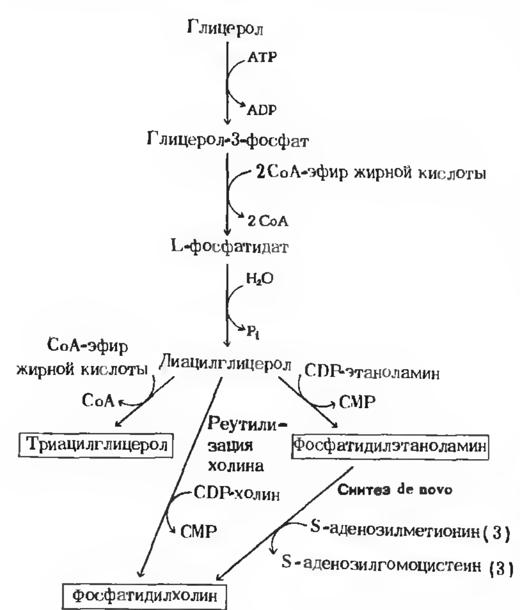


Рис. 21-15. Обобщенная схема синтеза глицеролсодержащих липидов, показывающая, что триацилглицеролы и два основных глицеролсодержащих фосфолипида имеют общих предшественников. Ферменты, участвующие в биосинтезе фосфоглицеридов из диацилглицеролов, прочно связаны с эндоплазматическим ретикулумом.

фосфатидилэтаноламина *фосфоэтаноламинная* голова присоединяется к хвосту молекулы путем взаимодействия диацилглицерола с *цитидиндифосфатэтаноламином*, который образуется из трех предшественников: *этаноламина*, *ATP* и *цитидинтрифосфата* (CTP, рис. 14-18). Вначале под действием *этаноламинкиназы* происходит образование фосфоэтаноламина:

$$\text{ATP} + \text{Этаноламин} \xrightarrow{Mg^{2+}}$$

$$\rightarrow \text{ADP} + \text{Фосфоэтаноламин.}$$

Фосфоэтаноламин реагирует затем с CTP, образуя *цитидиндифосфатэтаноламин* и пирофосфат (рис. 21-16). Эту реакцию катализирует *фосфоэтаноламинцитидилтрансфераза*:

$$\text{CTP} + \text{Фосфоэтаноламин} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{CDP-этаноламин} + PP_i.$$

Присоединение полярной головы к диацилглицеролу с образованием фосфатидилэтаноламина (рис. 21-17) осуществляется при помощи фермента *этаноламинфосфотрансферазы*:

$$\text{CDP-этаноламин} +$$
$$+ \text{Диацилглицерол} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Фосфатидилэтаноламин} + \text{CMP}.$$

Подобно тому как ATP переносит активированные фосфатные группы, а CDP-глюкоза – глюкозильные группы, CDP-этаноламин переносит активированные фосфоэтаноламинные группы. В данном случае мы видим еще один пример того, каким образом нуклеотиды могут выполнять функцию переносчиков определенных химических группировок в метаболизме клеток. Цитидиновые нуклеотиды специфичны для данной реакции: никакие другие нуклеозид-5'-трифосфаты не могут заменить CTP в животных тканях. Ключевую роль цитидиновых нуклеотидов в биосинтезе ли-

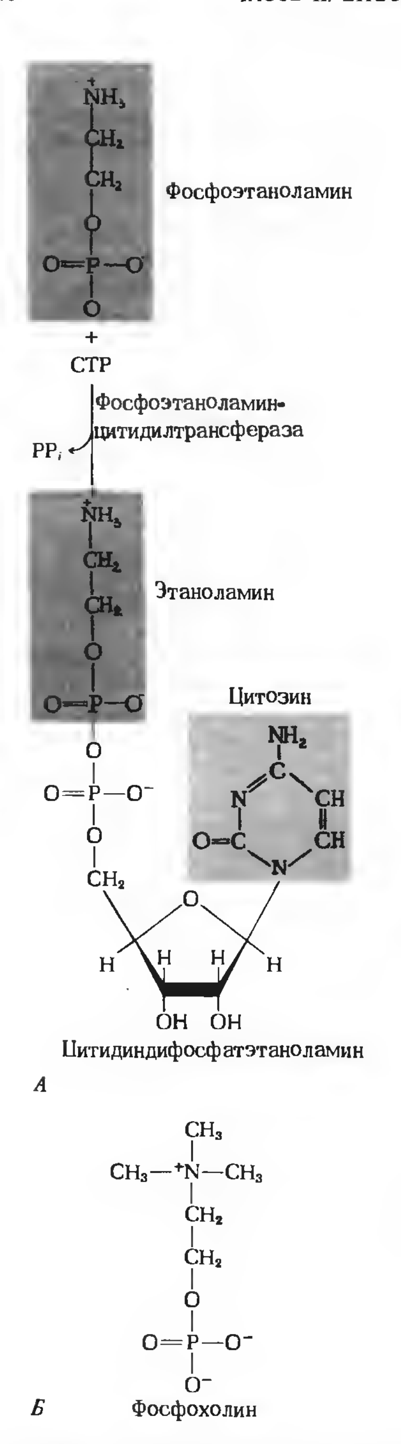


Рис. 21-16. *А*. Образование цитидиндифосфатэтаноламина. Цитидиндифосфатхолин образуется в результате аналогичной реакции из фосфохолина (*Б*).

Диацилглицерол

CDP-этаноламин

Этаноламинфосфотрансфераза

CMP

Полярная голова

Фосфатидилэтаноламин

Углеводородные хвосты

Рис. 21-17. Образование фосфатидилэтаноламина из CDP-этаноламина и диацилглицерола. Зигзагообразные линии обозначают длинные углеводородные хвосты остатков жирных кислот.

пидов впервые обнаружил Юджин П. Кеннеди.

21.12. Фосфатидилхолин образуется двумя разными путями

Один путь биосинтеза фосфатидилхолина называют синтезом de novo («с самого начала»), поскольку в этом случае не требуется наличия предобразованного

холина в качестве предшественника. При синтезе de novo (рис. 21-15) холиновая голова молекулы фосфатидилхолина не встраивается в молекулу в готовом виде, а образуется из этаноламина, входящего в состав фосфатидилэтаноламина, путем трехкратного метилирования. Донором метильных групп служит *S-аденозилметионин* (SAM; рис. 21-18) – активированная форма метионина, в которой метильная группа обладает повышенной реакционной способностью. Реакции протекают в следующей последовательности:

Фосфатидилэтаноламин +
+ S-аденозилметионин →
→ Фосфатидилмонометилэтаноламин +
+ S-аденозилгомоцистеин

Фосфатидилмонометилэтаноламин +
+ SAM → Фосфатидилдиметил-этаноламин + S-аденозилгомоцистеин

Фосфатидилдиметилэтаноламин +
+ SAM → Фосфатидилхолин +
+ S-аденозилгомоцистеин

Другой путь синтеза фосфатидилхолина получил название «спасательного» (salvage) пути, поскольку холин, образовавшийся при распаде фосфатидилхолина в процессе метаболизма, как бы спасается от разрушения и вновь используется в готовом виде для построения фосфатидилхолина. Этот путь очень похож на путь синтеза фосфатидилэтаноламина (рис. 21-15). На первом этапе синтеза свободный холин активируется при помощи ATP под действием *холинкиназы* с образованием *фосфохолина*:

$$\text{ATP} + \text{Холин} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{Фосфохолин}.$$

Фосфохолин реагирует затем с CTP, образуя *цитидиндифосфатхолин*:

CTP + Фосфохолин →
→ CDP-холин + PP_i.

CDP-холин взаимодействует с 1,2-диацилглицеролом, в результате чего образуется фосфатидилхолин:

CDP-холин + 1,2-диацилглицерол →
→ CMP + Фосфатидилхолин.

«Спасательный» путь синтеза фосфатидилхолина необходим многим животным, так как их способность синтезировать это соединение de novo ограниченна. Это обусловлено тем, что метильные группы в форме S-аденозилметионина, необходимые для такого синтеза, образуются из незаменимой аминокислоты метионина. При недостаточном содержании метионина в пище возможность метилирования фосфатидилэтаноламина и других акцепторов метильных групп становится ограниченной. В этих условиях организм старается «спасти» и повторно использовать уже метилированный свободный холин. Фактически при недостатке метионина в рационе животных его можно хотя бы частично компенсировать за счет содержащегося в пище холина. Таким образом, в неко-

Рис. 21-18. S-аденозилметионин (SAM) и продукт, образующийся при его деметилировании – S-аденозилгомоцистеин.

торых случаях холин может служить дополнительным витамином (гл. 26).

Другие обнаруживаемые в мембранах фосфолипиды (табл. 21-2) – *фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол* и *кардиолипин* (разд. 12.5) – образуются из диацилглицеролов и CDP-производных в реакциях, аналогичных описанным выше.

Таблица 21-2. Основные мембранные липиды, содержащиеся в животных клетках (см. гл. 12)

Фосфатидилхолин	Кардиолипин
Фосфатидилэтаноламин	Сфингомиелин
Фосфатидилсерин	Цереброзиды
Фосфатидилинозитол	Ганглиозиды

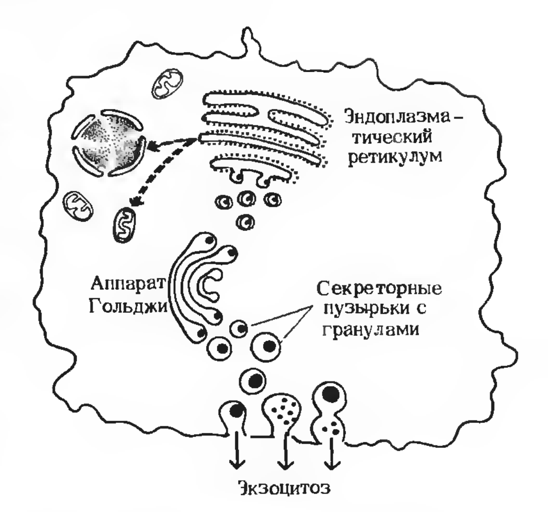


Рис. 21-19. Молекулы различных полярных липидов после завершения их синтеза встраиваются в липидный бислой клеточных мембран в определенных соотношениях. Основная масса полярных липидов встраивается в бислой мембран эндоплазматического ретикулума. Эти липиды поступают затем последовательно в мембраны аппарата Гольджи, секреторные пузырьки и плазматическую мембрану. При помощи специфических белков липиды эндоплазматического ретикулума переносятся через цитозоль и встраиваются в митохондриальные мембраны. Путь мембранных липидов показан красным цветом.

21.13. Полярные липиды встраиваются в клеточные мембраны

Полярные липиды, к числу которых относятся только что рассмотренные фосфоглицеролы, сфинголипиды и гликолипиды, не запасаются в жировых клетках, а встраиваются в клеточные мембраны, причем в строго определенных соотношениях. Фосфоглицеролы, синтезируемые ферментами эндоплазматического ретикулума, встраиваются в основном в липидный бислой ретикулума. Общая площадь эндоплазматического ретикулума особенно велика в клетках печени и поджелудочной железы. Мембраны эндоплазматического ретикулума служат предшественниками мембран аппарата Гольджи. От аппарата Гольджи постоянно отшнуровываются мембранные пузырьки, в которых продукты секреции транспортируются к плазматической мембране (рис. 21-19). Эти пузырьки часто сливаются с плазматической мембраной. Фосфоглицеролы могут переноситься из эндоплазматического ретикулума в митохондрии также при помощи транспортных белков. Таким образом, в клетке существует поток вновь синтезированных полярных липидов, направленный к различным типам клеточных мембран.

21.14. Генетические дефекты липидного обмена

Все полярные липиды в мембранах постоянно обновляются в процессе метаболизма; при нормальных условиях в клетке устанавливается динамическое стационарное состояние, при котором скорость синтеза липидов равна скорости их распада. Расщепление липидов катализируется гидролитическими ферментами, способными расщеплять строго определенные ковалентные связи. Например, расщепление фосфатидилхолина, главного мембранного липида, происходит при помощи нескольких разных фосфолипаз. Способ их действия показан на рис. 21-20.

Метаболизм мембранных сфинголипидов, к которым относятся сфингомиелин, цереброзиды и ганглиозиды (разд. 12.6), особенно подвержен нарушениям, обусловленным генетическими дефектами

Фосфолипаза A_1

$$H-\underset{|}{\overset{H}{\overset{|}{C}}}-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-R_1$$

Фосфолипаза A_2

$$H-\underset{|}{C}-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-R_2$$

Фосфолипаза D

$$H-\underset{\underset{H}{|}}{C}-O-\underset{\underset{OH}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}-O-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Фосфолипаза C

Рис. 21-20. Места действия фосфолипаз на фосфатидилхолин. R_1 и R_2 – длинноцепочечные остатки жирных кислот.

ферментов, участвующих в их деградации. При этом сфинголипиды или продукты их частичного распада накапливаются в тканях в больших количествах, поскольку синтез сфинголипидов протекает нормально, а их расщепление нарушено. Например, при такой редкой генетической аномалии, как *болезнь Нимана – Пика*, сфингомиелин накапливается в мозгу, селезенке и печени. Болезнь проявляется у детей уже вскоре после рождения и приводит к задержке умственного развития и смерти в раннем возрасте. Причиной болезни Нимана – Пика является генетически обусловленное нарушение процесса расщепления сфингомиелина ферментом *сфингомиелиназой*, которая отщепляет фосфохолин от сфингомиелина (строение этих соединений изображено на рис. 12-11).

Значительно чаще встречается *болезнь Тея – Сакса*, при которой из-за отсутствия лизосомного фермента *N-ацетилгексозаминидазы*, осуществляющего гидролиз специфической связи между остатками N-ацетил-D-галактозамина и D-галактозы в полярной голове молекулы ганглиозида (рис. 21-21), в мозгу и селезенке накапливаются ганглиозиды определенного типа. Вследствие того что расщепление ганглиозидов прекращается на одном из промежуточных этапов, происходит накопление больших количеств частично расщепленных ганглиозидов, что приводит в результате дегенеративных процессов в нервной системе к задержке умственного развития, слепоте и смерти в раннем возрасте (рис. 21-22).

Если считать по отношению ко всему населению в целом, то болезнь Тея – Сакса – явление редкое (1 случай на 300 000 рождений), однако среди евреев ашкенази (выходцев из Центральной Европы), которые составляют 90% всего еврейского населения Америки, ее частота очень высока (1 случай на 3600 новорожденных); каждый 28-й еврей ашкенази является носителем рецессивного дефектного гена. Если дефектный ген имеется у обоих ро-

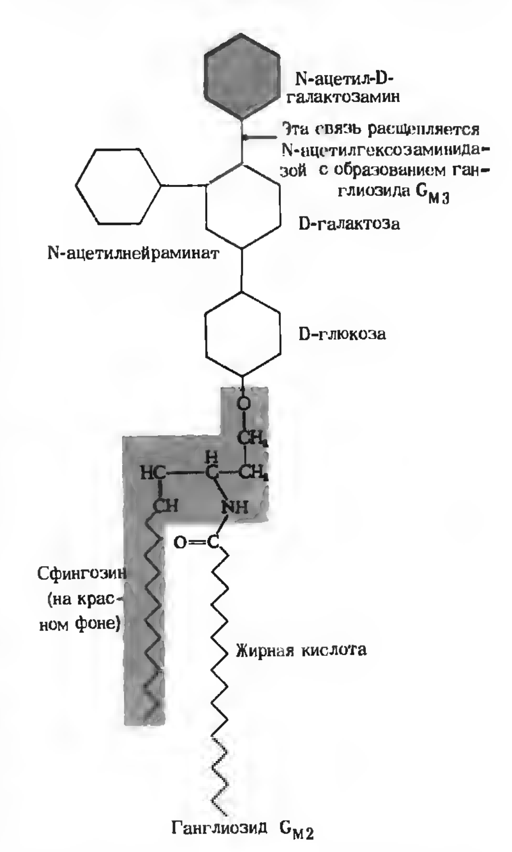


Рис. 21-21. Генетический дефект при болезни Тея – Сакса. В результате нормального расщепления ганглиозида G_{M2} под действием лизосомного фермента N-ацетилгексозаминидазы образуется N-ацетил-D-галактозамин и ганглиозид G_{M3}. При болезни Тея – Сакса этот фермент поврежден и поэтому в лизосомах, главным образом в клетках мозга, накапливается ганглиозид G_{M2}.



А



Б

Рис. 21-22. *А*. Годовалый ребенок с болезнью Тея – Сакса. Уже началось поражение мозга, вслед за которым наступит слепота. Лишь немногие дети с этим заболеванием доживают до пяти лет. *Б*. Электронная микрофотография части пораженной клетки мозга, на которой видны аномальные скопления ганглиозидов в лизосомах.

дителей, вероятность проявления болезни Тея – Сакса у детей сильно возрастает. Из-за необратимого характера заболевания, приводящего к тяжелой инвалидности, важное значение приобретает генетическое консультирование супругов. Разработаны тесты, позволяющие выявлять наличие рецессивного гена у будущих родителей. Носителей этого гена можно выявить, определив активность гексозаминидазы А в культурах фибробластов, полученных путем биопсии кожи. Генетический статус плода можно также установить, определив активность фермента в клетках, полученных из амниотической жидкости. Метод исследования образцов амниотической жидкости называется *амниоцентезом*.

21.15. Существуют многочисленные лизосомные болезни

Болезни Тея – Сакса, Нимана – Пика и многие другие генетические заболевания, при которых происходит неполное расщепление сфинголипидов и протеогликанов, носят общее название лизосомных болезней (табл. 21-3). Они называются так потому, что многие этапы ферментативной деградации сфинголипидов и протеогликанов протекают в *лизосомах* – окруженных мембраной мелких цитоплазматических пузырьках, в которых происходит переваривание некоторых клеточных компонентов. Лизосомы захватывают макромолекулы и не-

Таблица 21-3. Некоторые лизосомные болезни

Большинство лизосомных болезней обусловлено аномалиями ферментов, участвующих в гидролизе или расщеплении сложных липидов, гликогена, гликопротеинов и протеогликанов

Заболевание	Аномальный фермент
Болезнь Фабри	Тригексозилцерамид-галактозилгидролаза
Ганглиозидоз	β-Галактозидаза
Синдром Хёрлера	α-L-идуронидаза
Болезнь Гоше	Глюкоцереброзидаза
Болезнь Краббе	Галактозилцерамид—β-галактозилгидролаза
Маннозидоз	α-Маннозидаза
Болезнь Нимана – Пика	Сфингомиелиназа
Болезнь Тея – Сакса	N-ацетилгексозаминидаза
Болезнь накопления гликогена (типы I, II и III)	См. табл. 20-3

растворимые клеточные компоненты и расщепляют их при помощи гидролитических ферментов на более мелкие водорастворимые продукты, которые затем диффундируют в цитозоль, где подвергаются дальнейшему метаболизму. Лизосомы содержат более 50 различных гидролитических ферментов, способных расщеплять липиды, мукополисахариды, гликоген и белки. Содержимое лизосом имеет слабокислую реакцию (pH около 5,5). При генетических нарушениях функций лизосомных ферментов неполностью расщепленные макромолекулы или нерастворимые липиды накапливаются в лизосомах, которые в результате настолько сильно разбухают и увеличиваются в размерах, что это приводит к нарушению нормального функционирования клеток. При лизосомных болезнях накопления, характеризующихся неполным расщеплением сфинголипидов, обычно наблюдается задержка умственного развития, так как по сравнению с другими тканями мозг особенно богат сфинголипидами. Когда расщепление сфинголипидов прерывается, нормальная функция клеток мозга оказывается нарушенной.

Еще одним примером лизосомных болезней является *синдром Хёрлера*, или *гаргоилизм*; при этом заболевании затрагивается фермент, участвующий в расщеплении мукополисахаридной части некоторых протеогликанов (разд. 11.13), что приводит к накоплению продуктов их частичного распада. У детей с таким заболеванием сильно изменены черты лица, на коже образуются грубые складки с высоким содержанием протеогликанов, наблюдаются задержка умственного развития и слепота. Неизбежна смерть в раннем возрасте.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования, в которых выясняется возможность исправления генетической недостаточности лизосомных ферментов методами биохимической инженерии. Одна из главных задач, поставленных в этих исследованиях, состоит в том, чтобы найти способ замены дефектного фермента на нормальный, каталитически активный. Например, в живых клетках, полученных от больных с синдромом Хёрлера, генетически дефектный фермент удается «исправить» в условиях in vitro путем добавления активного фермента, выделенного из нормальных клеток. Однако не так-то просто ввести в организм больного нормальный фермент, который должен заменить дефектный. Желательно, чтобы нормальный фермент был получен от человека; если же используется фермент другого биологического вида, необходимо убедиться в его иммунологической совместимости с организмом больного. Кроме того, фермент должен быть введен таким образом, чтобы он попал в лизосомы именно тех клеток, в которых проявляется генетическое нарушение. Еще один подход, описанный в гл. 30, состоит в том, что в хромосомы клеток, вырабатывающих дефектный фермент, встраивается нормальный активный ген, ответственный за синтез данного фермента, с тем чтобы клетки, исходя из информации, содержащейся в введенном гене, могли синтезировать нормальный активный фермент и обеспечивать его включение в лизосомы.

21.16. Холестерол и другие стероиды также синтезируются из двухуглеродных предшественников

Холестерол – это не только важный компонент некоторых клеточных мембран (разд. 12.10) и липопротеинов плазмы крови (разд. 12.8), но и предшественник многих других биологически важных стероидов – желчных кислот и различных стероидных гормонов. Так же как и длинноцепочечные жирные кислоты, холестерол синтезируется из ацетил-СоА, однако в этом случае ацетильные группы соединяются друг с другом иначе. Этот вывод был сделан на основе результатов экспериментов, в которых животным скармливали ацетат, меченный радиоактивным углеродом (^{14}C) по метильной группе, и ацетат, меченный тем же изотопом по карбоксильной группе. Из тканей животных, в пищу которых добавляли меченые мо-

лекулы этих двух типов, был выделен меченый холестерол. Путем его последовательного расщепления при помощи известных химических реакций были получены характерные продукты. Определение радиоактивности этих продуктов позволило установить места локализации в молекуле холестерола атомов углерода, происходящих из метильных и карбоксильных групп. Результаты этих пионерских экспериментов, проведенных Конрадом Блоком, Робертом Вудвордом и другими исследователями, показаны на рис. 21-23. Полученная информация послужила ключом для выяснения последовательности ферментативных ре-

Рис. 21-23. Происхождение атомов углерода в молекуле холестерола, установленное в экспериментах с использованием ацетата, меченного радиоактивным углеродом по метильной (выделен серым цветом) и карбоксильной (выделен красным цветом) группам.

акций в процессе биосинтеза холестерола, протекающего в несколько этапов (рис. 21-24).

На первом этапе в результате трех приведенных ниже реакций образуется *мевалоновая кислота* (рис. 21-25):

Ацетил-СоА +

+ Ацетил-СоА $\xrightarrow{\text{Тиолаза}}$

→ Ацетоацетил-СоА + СоА

Ацетоацетил-СоА +

+ Ацетил-СоА + H_2O $\xrightarrow{\text{Синтаза}}$

→ 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА +

+ СоА + H^+

3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА +

+ 2NADPH + $2H^+$ →

$\xrightarrow{\text{Гидроксиметилглутарил-СоА—редуктаза}}$

→ Мевалонат + СоА + $2NADP^+$

В ходе последующих реакций, составляющих второй этап биосинтеза холестерола, к мевалонату присоединяются три фосфатные группы, после чего фосфорилированный мевалонат теряет карбоксильную группу и два атома водорода; в результате получается Δ^3-изопентенилпирофосфат (рис. 21-26) – активированная форма *изопреновой единицы* (разд. 10.13). Шесть изопентенильных групп затем объединяются, теряя свои пирофосфатные группы, и образуют углеводород *сквален* (рис. 21-27), состоящий из 30 атомов углерода, 24 из которых соединены в цепочку, а остальные 6 входят в состав метильных боковых групп. Впервые сквален был выделен из печени акул (рода *Squalus*).

На третьем этапе биосинтеза холестерола происходит серия сложных ферментативных реакций, в результате которых линейная молекула сквалена превращается в циклическое соединение *ланостерол*, содержащее четыре типичных для стероидов конденсированных кольца (рис. 21-24). В ходе четвертой (заключительной) серии реакций ланостерол превращается в холестерол. За расшифровку этого необычного биосинтетического пути, наиболее сложного из всех известных, американец Конрад Блок, немец Феодор Линен и англичанин Джон Корнфорт были в 1961 г. удостоены Нобелевской премии.

Регуляция биосинтеза холестерола – это также очень сложный процесс. Лимитирующей стадией служит реакция на раннем этапе биосинтеза холестерола – превращение гидроксиметилглутарил-СоА в мевалонат (рис. 21-25). Эту реакцию катализирует сложный регуляторный фермент – *гидроксиметилглутарил-СоА – редуктаза*, активность которого в зависимости от условий мо-

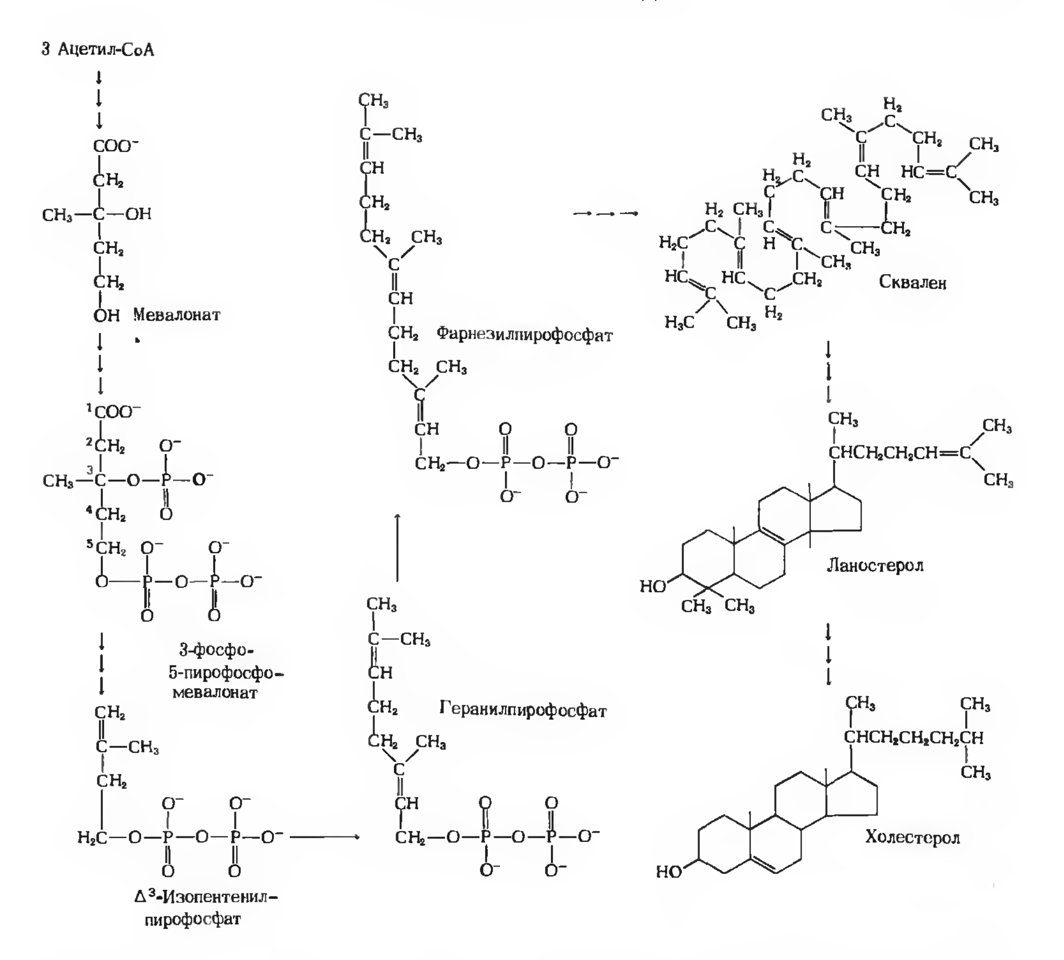


Рис. 21-24. Этапы биосинтеза холестерола. Из трех объединившихся молекул ацетил-CoA образуется мевалонат, фосфорилирование которого приводит к образованию 3-фосфо-5-пирофосфомевалоната. При отщеплении от него CO_2 и фосфата получается Δ^3-изопентенилпирофосфат. В результате последовательного объединения шести молекул Δ^3-изопентенилпирофосфата происходит формирование линейного углеводорода сквалена, который затем циклизуется, образуя ланостерол, превращающийся в холестерол.

жет меняться на два порядка. Этот фермент ингибируется конечным продуктом данного биосинтетического пути – холестеролом, а также мевалонатом. Гидроксиметилглутарил-CoA—редуктаза локализуется в эндоплазматическом ретикулуме; она может находиться как в фосфорилированном (неактивном), так и в нефосфорилированном (активном) состоянии. Биосинтез холестерола регулируется также концентрацией специфического белка – *переносчика стеролов*; этот белок связывает нерастворимые в воде промежуточные продукты биосинтеза и таким образом делает их более доступными для последующих ферментативных реакций. Скорость биосинтеза холестерола зависит не только от содержания в тканях холестерола и других стероидов; она меняется также при голодании, в зависимости от режима питания и при образовании злокачественных опухолей. Биосинтез холестерола ингибируется специфическими холестеролсодержащими липопротеинами плазмы при их связывании с соответствующими рецепторами на поверхности клеток.

Нарушение регуляции биосинтеза холестерола – один из факторов, влияющих на патологический процесс атерогенеза,

Рис. 21-25. Образование мевалоната из ацетил-CoA. Происходящие из ацетата 1-й и 2-й атомы углерода в молекуле мевалоната выделены красным цветом.

Рис. 21-26. Превращение мевалоната в Δ^3-изопентенилпирофосфат – активированную форму изопреновой единицы. Шесть таких единиц, объединившись, образуют сквален.

Рис. 21-27. Сквален, 30-углеродный изопреноидный углеводород, – предшественник ланостерола и холестерола. Изопреновые единицы разделены цветными пунктирными линиями.

в ходе которого в стенках артерий и артериол образуются «бляшки», богатые холестеролом и другими липидами. Образование таких «бляшек» может приводить к нарушению кровоснабжения различных органов, чаще всего от возникающего при этом недостатка кислорода страдают сердце и мозг (гл. 26).

21.17. Изопентенилпирофосфат служит предшественником многих жирорастворимых биомолекул

Образующийся из ацетил-СоА изопентенилпирофосфат представляет собой активированный предшественник, используемый для построения многих биологически важных молекул, содержащих изопреновые единицы (рис. 21-28). К ним относятся витамины A, E и K, каротиноиды, каучук, гуттаперча, фитольные боковые цепи хлорофилла (гл. 23), многие эфирные масла (такие, как душистые вещества, входящие в состав лимонного и эвкалиптового масел и мускуса), а также углеводороды, содержащиеся в скипидаре.

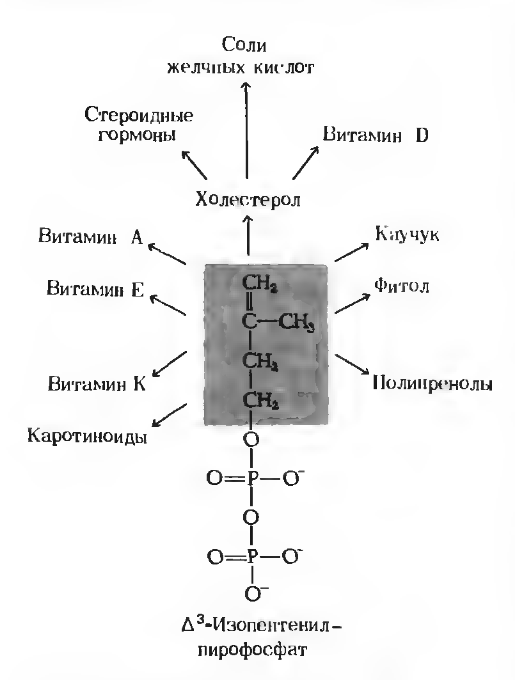


Рис. 21-28. Изопентенилпирофосфат – предшественник многочисленных изопреноидных соединений, в которых изопреновые единицы (выделены красным цветом), соединяясь друг с другом разными способами, образуют линейные или циклические структуры.

Краткое содержание главы

Длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты синтезируются из ацетил-СоА цитоплазматическим комплексом ферментов, к числу которых относится и ацилпереносящий белок (АПБ), содержащий в качестве простетической группы фосфопантетеин. В молекуле 3-кетоацил-АПБ—синтазы имеются две существенные для ее каталитической активности —SH-группы, одна из которых принадлежит фосфопантетеину (Фп), а другая – остатку цистеина (Cys). АПБ функционирует как переносчик промежуточных продуктов синтеза жирных кислот. Образующийся из ацетил-СоА ацетил-S-Cys-АПБ реагирует с малонил-S-АПБ, образовавшимся из малонил-СоА, в результате чего получается ацетоацетил-S-АПБ и выделяется CO_2. Вслед за этим происходит восстановление ацетоацетил-S-АПБ в D-3-гидроксипроизводное, которое затем гидратируется до *транс*-Δ^2-бутеноил-S-АПБ; двойная связь в ацильной группе этого соединения восстанавливается и насыщается за счет NADPH с образованием бутирил-S-АПБ. Далее к карбоксильному концу растущей цепи жирной кислоты последовательно присоединяются еще шесть молекул малонил-S-АПБ и в результате получается пальмитоил-S—Cys-АПБ — конечный продукт реакций, катализируемых синтазным комплексом для образования жирных кислот. Затем происходит гидролитическое отщепление свободной пальмитиновой кислоты. При удлинении пальмитиновой кислоты возникает 18-углеродная стеариновая кислота. Под действием оксигеназ со смешанной функцией в молекулах пальмитиновой и стеариновой кислот возникают двойные связи, что приводит к образованию соответственно пальмитолеиновой и олеиновой кислот. Млекопитающие не способны синтезировать линолевую кислоту и должны получать ее с пищей рас-

тительного происхождения; экзогенную линолевую кислоту они могут превращать в арахидоновую кислоту, которая служит предшественником простагландинов.

Триацилглицеролы синтезируются путем взаимодействия двух молекул CoA-производных жирных кислот с глицерол-3-фосфатом; при этом образуется фосфатидная кислота, которая затем дефосфорилируется до диацилглицерола. Последний ацилируется третьей молекулой CoA-производного жирной кислоты с образованием триацилглицерола. Диацилглицеролы являются также главными предшественниками фосфоглицеролов. Голова молекулы фосфатидилэтаноламина сначала формируется в виде цитидиндифосфатэтаноламина путем взаимодействия цитидинтрифосфата (CTP) с фосфоэтаноламином. Далее фосфоэтаноламинная группа переносится на диацилглицерол, что приводит к образованию фосфатидилэтаноламина. Фосфатидилхолин образуется путем метилирования фосфатидилэтаноламина или при взаимодействии диацилглицерола с цитидиндифосфатхолином. Холестерол также синтезируется из ацетил-CoA в результате очень сложной последовательности реакций, в которых образуются важные промежуточные соединения – гидроксиметилглутарил-CoA, мевалонат и линейный углеводород сквален. Последний циклизуется с образованием циклической стероидной системы конденсированных колец с боковой цепью. Биосинтез холестерола ингибируется поступающим с пищей холестеролом.

ЛИТЕРАТУРА

Биосинтез жирных кислот

Cunningham E. B. Biochemistry: Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, New York, 1978. В гл. 12 приведено много дополнительных сведений, касающихся энзимологии и механизма синтеза жирных кислот.

Jeffcoat R. The Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids and Its Control in Mammalian Liver, Essays Biochem., **15**, 1–36 (1979).

Биосинтез липидов

Snyder F. (ed.). Lipid Metabolism in Mammals, vols. 1 and 2, Plenum, New York, 1977.

Обмен холестерола

Bloch K. S. The Biological Synthesis of Cholesterol, Science, **150**, 19–28 (1965).

Brown M. S., Goldstein J. L. Receptor-Mediated Control of Cholesterol Metabolism, Science, **191**, 150–154 (1976).

Общие вопросы

Clarke M. R. The Head of the Sperm Whale, Sci. Am., **240**, 128–141, January 1979. Более подробные сведення о биологической функции спермацета у кашалотов.

Nelson R. A. Protein and Fat Metabolism in Hibernating Bears, Fed. Proc., **39**, 2955–2958 (1980).

Генетические нарушения липидного обмена

Allison A. C. Lysosomes. In: J. J. Head (ed.). Carlina Biology Readers, Carolina Biological Supply Company, Burlington, N. C., 1977.

Brown M. S., Goldstein J. L. Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 788–792 (1974).

Dietschy J. M., Gotto A. M., Jr., Ontko J. A. (eds.). Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism, American Physiological Society, 1978.

Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds.). The Metabolic Besis of Inherited Disease, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1978.

Вопросы и задачи

1. *Роль двуокиси углерода в синтезе жирных кислот.* Двуокись углерода – обязательный участник биосинтеза жирных кислот. В чем заключается специфическая роль CO_2? Будет ли пальмитат, образовавшийся при инкубации растворимой фракции печени с $^{14}CO_2$ и другими компонентами, необходимыми для биосинтеза жирных кислот, содержать ^{14}C? Обоснуйте ваш ответ.
2. *Путь углерода в синтезе жирных кислот.* Опираясь на ваши знания о биосинтезе жирных кислот, объясните следующие экспериментальные данные:
   а) Добавление равномерно меченного ^{14}C-ацетил-CoA к растворимой фракции печени приводит к образованию равномерно меченного ^{14}C-пальмитата.

б) Вместе с тем добавление к растворимой фракции печени *следовых количеств* равномерно меченного ^{14}C-ацетил-СоА в присутствии избытка малонил-СоА приводит к образованию пальмитата, содержащего ^{14}C только в положениях 15 и 16.

3. *Суммарное уравнение синтеза жирных кислот.* Напишите суммарное уравнение биосинтеза пальмитиновой кислоты в печени крысы, начиная с митохондриального ацетил-СоА и цитозольных NADPH, АТР и CO_2.

4. *Путь водорода в синтезе жирных кислот.* Возьмем препарат, содержащий все ферменты и кофакторы, необходимые для биосинтеза жирной кислоты из ацетил-СоА и малонил-СоА.

а) Сколько атомов дейтерия (тяжелого изотопа водорода) включится в каждую молекулу пальмитиновой кислоты, если в качестве субстратов использовать меченный дейтерием ацетил-СоА

$$CD_3—C(=O)—S—CoA$$

и избыток немеченого малонил-СоА? В каких положениях они будут находиться? Ответ объясните.

б) Сколько атомов дейтерия включится в каждую молекулу пальмитата, если в качестве субстратов использовать немеченый ацетил-СоА и меченный дейтерием малонил-СоА

$$^{-}OOC—CD_2—C(=O)—S—CoA$$

В каких положениях они будут находиться? Дайте объяснение.

5. *Образование NADPH, необходимого для биосинтеза жирных кислот.* Поскольку внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-СоА, ацетильные группы попадают в цитозоль посредством челночного переноса (см. схему на рис. 21-3). В цитозоле содержится NADP-зависимая малатдегидрогеназа, катализирующая реакцию

$$\text{Малат} + NADP^+ \rightarrow \text{Пируват} + CO_2 + NADPH + H^+.$$

Считая, что внутренняя мембрана митохондрий проницаема для пирувата (а также для цитрата и малата), предложите челночную схему образования NADPH в цитозоле при помощи NADP-зависимой малатдегидрогеназы и других ферментов, о которых известно, что они локализованы в митохондриях и цитозоле. Напишите суммарную реакцию переноса ацетильных групп из митохондрий в цитозоль.

6. *Активность ацетил-СоА—карбоксилазы изменяется под действием модуляторов.* Ацетил-СоА—карбоксилаза является ключевым регуляторным пунктом биосинтеза жирных кислот. Некоторые характеристики этого фермента приведены ниже.

а) Добавление цитрата или изоцитрата повышает V_{max} фермента более чем в 10 раз.

б) Фермент существует в двух резко различающихся по активности формах, которые могут превращаться друг в друга.

Протомер ⇌ Нитевидный полимер
Неактивный Активный

Цитрат и изоцитрат связываются предпочтительно с нитевидной формой фермента, а пальмитоил-СоА – с протомерной.

Объясните, как эти свойства связаны с регуляторной ролью ацетил-СоА—карбоксилазы в биосинтезе жирных кислот.

7. *Сколько «стоит» синтез триацилглицеролов.* Исходя из суммарного уравнения биосинтеза трипальмитина из глицерола и пальмитиновой кислоты, подсчитайте, сколько молекул АТР требуется для образования одной молекулы трипальмитина.

8. *Энергетические затраты в ходе синтеза фосфатидилхолина.* Напишите последовательные этапы и суммарное уравнение для биосинтеза фосфатидилхолина по «спасательному» пути из олеиновой и пальмитиновой кислот, дигидроксиацетонфосфата и холина. Сколько молекул АТР потребуется для синтеза фосфатидилхолина этим способом, если начинать его с олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты и дигидроксиацетонфосфата?

9. *Лечение гиперхолестеринемии.* Растения не синтезируют холестерол, а вырабатывают другие стеролы, называемые фитостеролами. Строение одного из них – β-ситостерола – здесь показано. Когда больные с гиперхолестеринемией получают с пищей β-ситостерол, уровень холестерола в плазме у них снижается, что должно уменьшать вероятность заболевания атеросклерозом. Предложите воз-

можные механизмы действия β-ситостерола.

Задача 9

β-Ситостерол

10. *Взаимосвязь метаболизма аминокислот с метаболизмом жирных кислот.* Крысе ввели препарат 3-^{14}C-аланина

$$^{*}CH_3-\underset{^{+}NH_3}{\overset{H}{C}}-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow O^-\end{matrix}$$

Через час после этого животное забили и из печени экстрагировали липиды. Полученный при экстракции пальмитат содержал ^{14}C. Как это можно объяснить? В каком месте молекулы пальмитата находится ^{14}C? Может ли аланин служить предшественником в реальном синтезе пальмитата de novo?

11. *Различия между анаболическими и катаболическими путями жирных кислот.*

Один оборот анаболического и катаболического циклов короткоцепочечных жирных кислот можно представить уравнением

$$CH_3-CH_2-CH_2-COO^- \rightleftharpoons \underset{\text{Анаболический путь}}{\overset{\text{Катаболический путь}}{\rightleftharpoons}} 2CH_3-COO^-$$

а) Сравните суммарные уравнения катаболического и анаболического путей. Являются ли они просто обратными реакциями по отношению друг к другу? В чем их различия?

б) Какие специфические факторы позволяют этим путям идти независимо друг от друга?

ГЛАВА 22

БИОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ

Пути биосинтеза аминокислот и нуклеотидов рассматриваются в этой главе совместно по ряду причин. В молекулах аминокислот и нуклеотидов содержатся атомы азота, полученные из одних и тех же биологических источников. Более того, аминокислоты служат предшественниками при биосинтезе нуклеотидов. Есть и еще одно обстоятельство, связывающее аминокислоты и нуклеотиды: оба этих класса соединений играют роль элементарных единиц в биохимии наследственности. Нуклеотиды, кодирующие элементы нуклеиновых кислот, служат для сохранения и передачи генетической информации, тогда как аминокислоты, строительные блоки белков, обеспечивают ее реализацию.

Биосинтетические пути, ведущие к 20 аминокислотам, встречающимся в белках, и к восьми обычным нуклеотидам нуклеиновых кислот, многочисленны и по большей части довольно сложны. Мы не станем подробно описывать здесь все эти пути; вместо этого мы сосредоточим свое внимание на главных метаболических принципах, лежащих в их основе. Поскольку аминокислоты и нуклеотиды требуются организму в сравнительно небольших количествах, метаболический поток почти никогда не бывает здесь столь большим, как на путях, ведущих в животных тканях к углеводам или жирам. Вместе с тем для обеспечения синтеза белков и нуклеиновых кислот необходимо, чтобы различные аминокислоты и нуклеотиды образовывались в нужном соотношении и в надлежащее время, а это означает, что соответствующие биосинтетические пути должны регулироваться очень строго и координированно.

На других примерах мы уже убедились в том, что пути биосинтеза и расщепления тех или иных соединений неидентичны. Точно так же неидентичны они для аминокислот и нуклеотидов. Кроме того, и в этом случае биосинтетические и катаболические пути регулируются независимо друг от друга.

22.1. Некоторые аминокислоты должны поступать в организм с пищей

Разные виды живых организмов сильно различаются по своей способности синтезировать 20 различных аминокислот. Различаются они также и по способности использовать те или иные формы азота в качестве предшественников аминогрупп. Человек и белая крыса, например, могут синтезировать только 10 из 20 аминокислот, необходимых для биосинтеза белков (табл. 22-1). Эти 10 аминокислот называются *заменимыми*; организм синтезирует их сам из аммиака и различных источников углерода. Другие 10 аминокислот должны поступать в организм с пищей; их называют *незаменимыми*. Высшие растения оснащены в этом смысле лучше: они могут синтезировать все аминокислоты, необходимые им для синтеза белка. Более того, они могут использовать в качестве предшественников аминогрупп не только аммиак,

Таблица 22.1. Заменимые и незаменимые аминокислоты для человека и белой крысы

Заменимые	Незаменимые
Глутамат	Изолейцин
Глутамин	Лейцин
Пролин	Лизин
Аспартат	Метионин
Аспарагин	Фенилаланин
Аланин	Треонин
Глицин	Триптофан
Серин	Валин
Тирозин	Аргинин[1]
Цистеин	Гистидин

[1] Незаменимой аминокислотой аргинин является только для молодых, растущих животных.

но и нитраты. Очень сильно различаются по своей способности синтезировать аминокислоты микроорганизмы. *Escherichia coli*, например, синтезирует из простых предшественников все аминокислоты, необходимые ей для синтеза белка, а молочнокислые бактерии неспособны к этому и некоторые аминокислоты должны получать в готовом виде, из среды.

22.2. К глутамату, глутамину и пролину ведет общий биосинтетический путь

Вначале мы познакомимся с биосинтезом заменимых аминокислот, т.е. тех аминокислот, которые синтезируются в организме человека, белой крысы и других млекопитающих. В большинстве случаев предшественником углеродного скелета заменимой аминокислоты служит соответствующая α-кетокислота, происходящая в конечном счете от того или иного промежуточного продукта цикла лимонной кислоты. Аминогруппы поступают обычно от глутамата в реакциях трансаминирования (разд. 19.1), катализируемых трансаминазами, у которых простетической группой служит пиридоксальфосфат (разд. 10.8).

α-Кетоглутарат
$H^+ + NADPH + NH_4^+$
$NADP^+$
Глутаматдегидрогеназа
Глутамат
$ATP + NH_4^+$
Глутаминсинтетаза
$ADP + P_i + H^+$
Пролин
Глутамин

Рис. 22-1. Биосинтез трех родственных аминокислот – глутамата, глутамина и пролина. Путь превращения глутамата в пролин представлен на рис. 22-2.

Биосинтетические пути, ведущие к трем родственным аминокислотам – *глутамату*, *глутамину* и *пролину* (рис. 22-1), несложны и у всех форм жизни, по-видимому, одинаковы. Глутамат образуется из аммиака и α-кетоглутарата (промежуточного продукта цикла лимонной кислоты) под действием L-глутаматдегидрогеназы. В качестве источника восстановительных эквивалентов в глутаматдегидрогеназной реакции используется NADPH

$$NH_4^+ + \alpha\text{-Кетоглутарат} + NADPH \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons L\text{-глутамат} + NADP^+ + H_2O.$$

Эта реакция имеет фундаментальное значение для биосинтеза *всех* аминокислот,

потому что глутамат служит при биосинтезе других аминокислот донором аминогрупп в реакциях трансаминирования. L-глутаматдегидрогеназа локализована в матриксе митохондрий.

Глутамин образуется из глутамата в реакции, катализируемой *глутаминсинтетазой*

$$\text{Глутамат} + NH_4^+ + ATP \rightarrow \text{Глутамин} + ADP + P_i + H^+.$$

Напомним, что промежуточным продуктом этой реакции, протекающей в два этапа, служит *глутамил-5-фосфат* (разд. 19.12).

$$\text{Глутамат} + ATP \rightleftharpoons \text{Глутамил-5-фосфат} + ADP$$

$$\text{Глутамил-5-фосфат} + NH_4^+ \rightleftharpoons \text{Глутамин} + P_i + H^+$$

Суммарная реакция: $\text{Глутамат} + ATP + NH_4^+ \rightleftharpoons \text{Глутамин} + ADP + P_i + H^+$

Глутамат

ATP + H⁺ + NADPH → ADP + NADP⁺ + P_i — Глутамат-киназа – дегидрогеназа

γ-Полуальдегид

H_2O — Спонтанно

Δ^1-Пирролин-5-карбоксилат

H⁺ + NADPH → NADP⁺ — Пирролинкарбоксилат-редуктаза

Пролин

Рис. 22-2. Биосинтез L-пролина. Все пять углеродных атомов пролина происходят из глутаминовой кислоты. Пролин действует как аллостерический ингибитор фермента, катализирующего первую реакцию на пути биосинтеза пролина. Эта регуляция по типу отрицательной обратной связи показана здесь красной стрелкой, а ингибируемая реакция отмечена поперечной красной полоской.

Это тоже одна из важных центральных реакций в обмене аминокислот, потому что это главный путь превращения свободного аммиака, который, как известно, токсичен, в нетоксичный глутамин для переноса кровью (разд. 19.12). Глутаминсинтетаза – аллостерический фермент. У *E. coli* и других прокариот каталитическая активность глутаминсинтетазы регулируется несколькими метаболитами, о чем мы еще будем говорить ниже.

Пролин, представляющий собой циклическое производное глутамата, образуется, как показано на рис. 22-2. Сначала глутамат восстанавливается до соответствующего γ-полуальдегида, а потом происходит замыкание кольца, сопровождающееся дальнейшим восстановлением, в результате чего и образуется пролин.

22.3. Аланин, аспартат и аспарагин тоже образуются из центральных метаболитов

У большинства организмов две заменимые аминокислоты – *аланин* и *аспартат* – образуются в результате трансаминирования соответственно из пирувата и оксалоацетата:

$$\text{Глутамат} + \text{Пируват} \rightleftharpoons \alpha\text{-Кетоглутарат} + \text{Аланин},$$

$$\text{Глутамат} + \text{Оксалоацетат} \rightleftharpoons \alpha\text{-Кетоглутарат} + \text{Аспартат}.$$

У многих бактерий аспартат служит непосредственным предшественником *аспарагина* в реакции, катализируемой

аспарагинсинтетазой (эта реакция аналогична глутаминсинтетазной):

$$\text{Аспартат} + NH_4^+ + ATP \rightleftharpoons \text{Аспарагин} + ADP + P_i + H^+.$$

Однако в организме млекопитающих существует другой путь для синтеза аспарагина: в этом случае при помощи *ATP-зависимой аспарагинсинтетазы* на β-карбоксильную группу аспартата переносится амидная аминогруппа глутамина (рис. 22-3)

$$\text{Глутамин} + \text{Аспартат} + ATP + H_2O \rightarrow \text{Глутамат} + \text{Аспарагин} + AMP + PP_i.$$

$^-OOC—CH(^+NH_3)—CH_2—COO^-$ Аспартат

+

$^-OOC—CH(^+NH_3)—CH_2—CH_2—C(=O)NH_2$ Глутамин

ATP → AMP + PP_i; Аспарагинсинтетаза (ATP-зависимая)

$^-OOC—CH(^+NH_3)—CH_2—C(=O)NH_2$ Аспарагин

+

$^-OOC—CH(^+NH_3)—CH_2—CH_2—COO^-$ Глутамат

Рис. 22-3. Образование аспарагина из аспартата в животных тканях. У многих бактерий аспарагин образуется другим путем (см. текст).

22.4. Тирозин образуется из незаменимой аминокислоты фенилаланина

Тирозин – заменимая аминокислота, но у животных он образуется из незаменимой аминокислоты *фенилаланина* путем гидроксилирования фенильной группы в положении 4; эта реакция катализируется фенилаланин-4-монооксигеназой, которая принимает участие также и в расщеплении фенилаланина (разд. 19.5). В качестве ковосстановителя молекулы кислорода в этой реакции используется NADPH; напомним, что фенилаланин-4-монооксигеназа принадлежит к *монооксигеназам*, или *оксидазам со смешанной функцией* (разд. 17.25). Реакция описывается следующим уравнением:

$$\text{Фенилаланин} + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow \text{Тирозин} + NADP^+ + H_2O.$$

22.5. Цистеин образуется из двух других аминокислот – метионина и серина

У млекопитающих *цистеин* образуется из незаменимой аминокислоты *метионина* и заменимой аминокислоты *серина*. Метионин поставляет для синтеза цистеина атом серы, а серин – углеродный скелет. В первой реакции этого биосинтетического пути метионин взаимодействует с ATP и превращается в *S-аденозилметионин* (рис. 22-4)

$$\text{L-метионин} + ATP + H_2O \rightarrow \text{S-аденозилметионин} + PP_i + P_i.$$

Аденозильная группа может рассматриваться как переносчик молекулы метионина. В этой форме метильная группа метионина обладает высокой реакционной способностью и может быть перенесена на любой из многих различных акцепторов метильных групп, после чего остает-

Рис. 22-4. Структура S-аденозилметионина. В этом производном метионина стабильный атом серы, участвующий в образовании тиоэфирной связи, приобретает высокую реакционную способность и может легко передавать метильную группу различным акцепторам.

ся деметилированный продукт S-*аденозилгомоцистеин*

S-аденозилметионин + Акцептор метильных групп →

→ S-аденозилгомоцистеин +
+ Метилированный акцептор.

Мы уже видели (разд. 21.12), что S-аденозилметионин служит донором метильных групп в ходе превращения фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин.

Образовавшийся после отщепления метильной группы S-аденозилгомоцистеин подвергается дальнейшим превращениям, в результате которых в конечном счете образуется *цистеин* (рис. 22-5). На следующем этапе получается свободный *гомоцистеин*

Рис. 22-5. Биосинтез цистеина из метионина и серина. Метионин поставляет для этого синтеза атом серы, а серин – углеродный скелет.

S-аденозилгомоцистеин + H_2O →
→ Аденозин + Гомоцистеин.

Затем гомоцистеин взаимодействует с серином в реакции, катализируемой *цистатионин—β-синтазой*, что приводит к образованию *цистатионина* (рис. 22-5)

Гомоцистеин + Серин →
→ Цистатионин + H_2O.

На последнем этапе *цистатионин—γ-лиаза*, также принадлежащая к числу ферментов, у которых простетической группой служит пиридоксальфосфат, катализирует удаление аммиака и расщепление цистатионина с образованием свободного цистеина (рис. 22-5)

Цистатионин + H^+ →
→ α-Кетобутират + NH_4^+ +
+ Цистеин.

Объединив все эти отдельные стадии, мы получим суммарное уравнение синтеза цистеина

L-метионин + ATP + Акцептор метильных групп + H_2O + H^+ +
+ Серин → Метилированный акцептор + Аденозин +
+ α-Кетобутират +
+ NH_4^+ + Цистеин + PP_i + P_i.

Конечный результат этой сложной последовательности реакций заключается в замене OH-группы серина на SH-группу, получаемую от метионина, что и приводит к образованию цистеина (рис. 22-5).

22.6. Серин служит предшественником глицина

Поскольку серин является предшественником глицина, пути биосинтеза этих двух аминокислот мы рассмотрим здесь вместе. Главный путь образования серина в тканях животных (рис. 22-6) начинается с *3-фосфоглицерата*, представляющего собой промежуточный продукт гликолиза. На первом этапе α-гидроксильная группа 3-фосфоглицерата окисляется за счет NAD^+ с образованием *3-фосфогидроксипирувата*. Последний вступает в реакцию трансаминирования с глутаматом, в результате чего образуется *3-фосфосерин*. И, наконец, 3-фосфосерин под действием *фосфосерин-фосфатазы* претерпевает гидролиз, что и приводит к образованию свободного серина.

Глицин, в молекуле которого содержатся два атома углерода, образуется из трехуглеродной аминокислоты серина путем отщепления одного атома углерода, а именно β-углеродного атома, т.е. С-3 (рис. 22-6). Эта реакция катализируется ферментом, для которого коферментом служит *тетрагидрофолат*, представляющий собой активную форму витамина, называемого *фолиевой кислотой* (разд. 10.10). Тетрагидрофолат выполняет роль акцептора β-углеродного атома серина при образовании глицина. Углеродный атом, отщепляемый от серина, образует метиленовый мостик (разд. 19.4) между атомами азота тетрагидрофолата в положениях 5 и 10, в результате получается N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат (рис. 22-7). Реакция образования глицина из серина обратима

Серин + Тетрагидрофолат ⇌
⇌ Глицин +
+ N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат +
+ H_2O.

N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат принадлежит к семейству коферментов, представляющих собой производные фолиевой кислоты; подобно S-аденозилметионину и коферменту B_{12}, эти производные фолиевой кислоты выполняют функцию переноса различных одноуглеродных групп (разд. 10.10). Одноуглеродный фрагмент, отщепляемый от серина при участии тетрагидрофолата, может переноситься на различные акцепторные молекулы.

В печени позвоночных глицин может образовываться другим путем (разд. 19.4), при участии фермента глицин-синтазы

CO_2 + NH_4^+ + NADH + H^+ +
+ N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат ⇌
⇌ Глицин + NAD^+ +
+ Тетрагидрофолат.

3-фосфоглицерат

NAD^+ → $H^+ + NADH$ Фосфоглицерат-дегидрогеназа

3-фосфогидроксипируват

Глутамат → α-Кетоглутарат Фосфосерин-трансаминаза

3-фосфосерин

3-фосфосерин

H_2O → P_i Фосфосерин-фосфатаза

Серин

Тетрагидрофолат → N^5, N^{10}-метилен-тетрагидрофолат, H_2O Серин-гидрокси-метилтрансфераза

Глицин

Рис. 22-6. Биосинтез серина из 3-фосфоглицерата и последующее превращение серина в глицин. Глицин может образоваться также из CO_2 + NH_3 под действием глицин-синтазы, которая в качестве донора метильных групп использует N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат (см. текст).

Как правило, пути синтеза незаменимых аминокислот сложнее и длиннее путей синтеза заменимых: первые обычно включают от пяти до пятнадцати этапов, а во вторых лишь в редких случаях насчитывается пять. Неспособность высших животных синтезировать незаменимые аминокислоты объясняется отсутствием у них одного или двух ферментов, необходимых для этого синтеза. Наибольшей сложностью отличаются пути, ведущие к синтезу таких незаменимых аминокислот, как *фенилаланин, триптофан* и *гистидин*, молекулы которых содержат бензольные кольца или гетероциклы. Синтез таких колец (особенно двух конденсированных колец триптофана) – сложный процесс, включающий целый ряд ферментативных этапов.

Рис. 22-7. Структура N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата. Метиленовая группа, которая переносится, показана на красном фоне (см. рис. 10-12).

22.7. Биосинтез незаменимых аминокислот

Пути биосинтеза аминокислот незаменимых для человека и белой крысы, были выяснены в результате биохимических и генетических исследований на микроорганизмах, способных синтезировать эти аминокислоты. Мы не будем здесь их рассматривать; ограничимся лишь некоторыми общими замечаниями.

Пять аминокислот, являющихся для животных незаменимыми, растения и микроорганизмы синтезируют из заме-

нимых аминокислот: из аспартата синтезируются *треонин, метионин* и *лизин*, а из глутамата – *аргинин* и *гистидин. Изолейцин* образуется у бактерий из незаменимой аминокислоты треонина.

22.8. Биосинтез аминокислот регулируется аллостерическими механизмами

Наиболее чувствительный тип регуляции синтеза аминокислот – это *аллостерическое ингибирование* первой реакции биосинтетического пути конечным продуктом данной последовательности реакций (разд. 9.18 и 13.11). Первая реакция биосинтетического пути обычно необратима и катализируется аллостерическим ферментом. На рис. 22-8 аллостерическая регуляция показана на примере синтеза изолейцина из треонина, о котором мы уже говорили ранее (разд. 9.18). Конечный продукт – изолейцин – действует как отрицательный модулятор первой реакции этого пути. Такого рода аллостерическая, или нековалентная, модуляция синтеза аминокислот обеспечивает у бактерий быстрый ответ на изменение ситуации.

Другим заслуживающим внимания примером может служить регуляция активности глутаминсинтетазы у *E. coli*, в которой участвует целый набор аллостерических эффекторов. У этой бактерии глутамин играет роль донора аминогрупп при биосинтезе многих метаболических продуктов (рис. 22-9). Известно восемь продуктов обмена глутамина, которые выполняют у *E. coli* функцию отрицательных модуляторов активности глутаминсинтетазы, действуя по типу обратной связи. Глутаминсинтетаза – один из самых сложных регуляторных ферментов, какие мы знаем.

Поскольку 20 обычных аминокислот требуются для белкового синтеза в определенных соотношениях, в клетках выработались механизмы, обеспечивающие не только регуляцию скорости синтеза отдельных аминокислот, но и *координирование* их синтеза. Особенно хорошо выражено такое координирование у быстро растущих бактериальных клеток. На

$CH_3—CH(OH)—CH(^+NH_3)—COO^-$ Треонин

Треониндегидратаза

$CH_3—CH_2—C(=O)—COO^-$ α-Кетобутират

Пируват → CO_2 Ацетолактатсинтаза

$CH_3—CH_2—C(OH)(C(=O)CH_3)—COO^-$ α-Ацето-α-гидроксибутират

H + NADPH → $NADP^+$ Редуктоизомераза гидроксикетокислот

$CH_3CH_2—C(CH_3)(OH)—C(H)(OH)—COO^-$ α, β-Дигидрокси-β-метилвалерат

H_2O Дегидратаза дигидроксикислот

$CH_3CH_2—C(CH_3)(H)—C(=O)—COO^-$ α-Кето-β-метилвалерат

Глутамат → α-Кетоглутарат Трансаминаза

$CH_3—CH_2—CH(CH_3)—C(H)(^+NH_3)—COO^-$ Изолейцин

Рис. 22-8. Биосинтез изолейцина из треонина у *E. coli*. Первая реакция этого биосинтетического пути ингибируется его конечным продуктом – изолейцином. Это один из первых изученных примеров аллостерического ингибирования по типу обратной связи. Валин способен устранять или предотвращать ингибирующее действие изолейцина.

рис. 22-10 показано, каким образом координируется у *E. coli* синтез четырех аминокислот, образующихся из аспартата, – лизина, метионина, треонина и изолейцина. Этап, ведущий от аспартата к аспартилфосфату, катализируется тремя *изоферментами*, регулируемыми независимо друг от друга. Этапы, на ко-

торых из полуальдегида аспартата образуется гомосерин, а из треонина – α-кетобутират, катализируются двумя изоферментами, также регулируемыми независимо. Один из изоферментов, катализирующих превращение аспартата в аспартилфосфат, может аллостерически ингибироваться двумя различными модуляторами – лизином и изолейцином, действие которых более чем аддитивно. Это еще один пример *согласованного* ингибирования (разд. 17.24). В последовательности реакций, ведущих от аспартата к изолейцину, действуют множественные взаимно перекрывающиеся виды ингибирования по типу обратной связи: изолейцин подавляет превращение треонина в α-кетобутират, а треонин тормозит

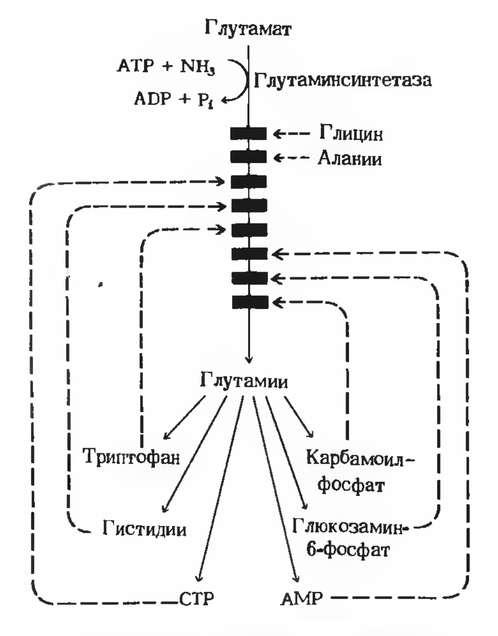


Рис. 22-9. Аллостерическое ингибирование глутаминсинтетазы у *E. coli*. У этого организма глутамин является предшественником указанных здесь продуктов. Все они способны ингибировать фермент по типу обратной связи. Такое действие нескольких отрицательных модуляторов называется согласованным ингибированием. Глутаминсинтетаза резко ингибируется также избытком АТР, под влиянием которого она переходит в неактивную форму вследствие ковалентной модификации тех остатков тирозина в ее субъединицах, которые важны для каталитической активности. В животных тканях активность глутаминсинтетазы регулируется гораздо более простым способом.

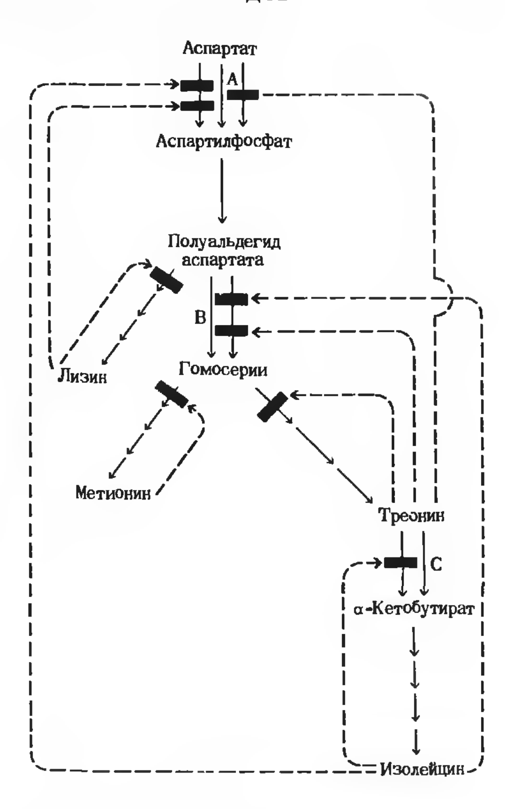


Рис. 22-10. Сложная сеть регуляторных механизмов, контролирующих у *E. coli* биосинтез нескольких аминокислот, образующихся из аспартата. Представленные здесь различные типы регуляции описаны в тексте. Там же разъяснены и обозначения, приведенные на рисунке.

свое собственное образование на трех стадиях, в которых субстратами служат гомосерин, полуальдегид аспартата и аспартат. Такое ингибирование называют *последовательным* ингибированием по типу обратной связи.

22.9. Биосинтез аминокислот регулируется также путем изменений концентрации ферментов

Еще один механизм регуляции биосинтеза аминокислот основан на контролируемом изменении концентрации ферментов, участвующих в биосинтезе. Если клетки не нуждаются в той или иной аминокислоте, будучи ею вполне обеспечены, то в них содержится очень мало ферментов, необходимых для ее биосинтеза. Ес-

ли же концентрация этой аминокислоты понизится и окажется уже недостаточной, клетки начинают вырабатывать больше таких ферментов. Регуляция этого типа осуществляется путем изменений в активности генов, кодирующих соответствующие ферменты. Всякий раз, когда продукт данного биосинтетического пути присутствует в достаточной концентрации, гены, кодирующие ферменты этого пути, инактивируются, или репрессируются. Когда же концентрация продукта данной последовательности реакций снижается, эти гены *дерепрессируются* и ферменты начинают вырабатываться в большем количестве. Дальше мы познакомимся с тем, как синтез ферментов регулируется при помощи механизмов генетической репрессии (гл. 29).

На рис. 22-10 показаны три изофермента (они обозначены буквами А, В и С), не имеющие аллостерических модуляторов. Активность этих изоферментов регулируется путем изменения скорости их синтеза в клетке; их называют *репрессируемыми* ферментами. Синтез изоферментов А и В репрессируется у *E. coli* при наличии достаточного количества метионина. Точно так же и синтез изофермента С репрессируется, если в среде в достаточном количестве присутствует изолейцин. Механизм, регулирующий биосинтез аминокислот путем репрессии и дерепрессии (гл. 29), обычно реагирует медленнее, чем механизм аллостерической регуляции.

Мы видим, таким образом, что в биосинтезе этой группы родственных аминокислот действует сложная сеть различного рода регуляторных механизмов. Быстро растущие бактериальные клетки координируют синтез всех аминокислот в высшей степени эффективно, не уступая в этом смысле компьютеру.

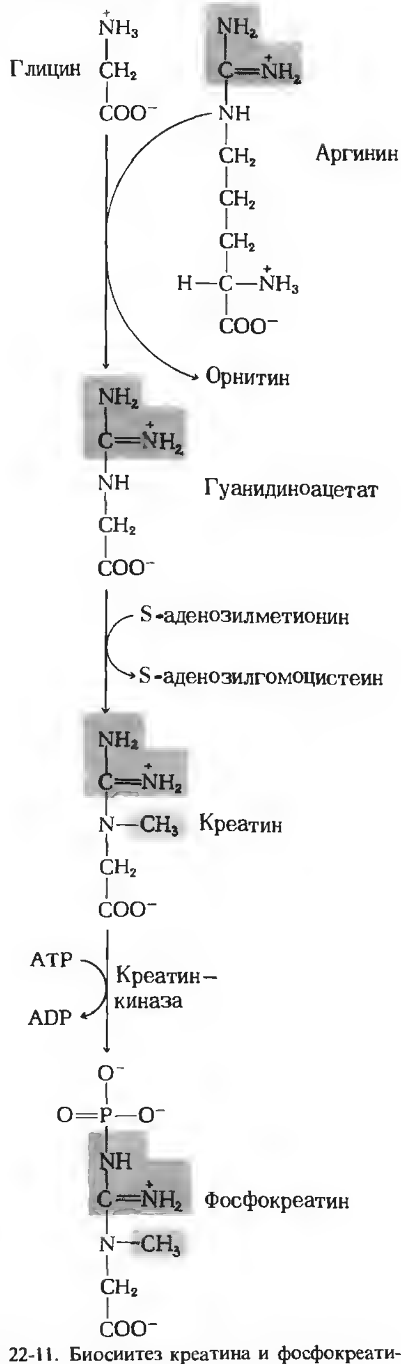


Рис. 22-11. Биосинтез креатина и фосфокреатина. Креатин образуется из трех аминокислот — глицина, аргинина и метионина. Аргинин служит донором гуанидиновой группы (показана на красном фоне), а метионин — донором метильной группы (серый фон). Этот метаболический путь свидетельствует о разнообразной роли аминокислот в качестве предшественников других азотсодержащих биомолекул.

22.10. Глицин является предшественником порфиринов

Аминокислоты — это не только строительные блоки белков. Они служат также предшественниками многих специализированных биомолекул — различных гормонов, витаминов, коферментов, алка-

Рис. 22-12. Биосинтез протопорфирина IX (порфирина, содержащегося в гемоглобине и миоглобине). Атомы углерода и азота, происходящие из глицина, выделены красным. Остальные углеродные атомы происходят из сукцинильной группы сукцинил-СоА.

лоидов, полимеров клеточной стенки, порфиринов, антибиотиков, пигментов и нейромедиаторов, т. е. веществ, каждое из которых играет какую-нибудь важную биологическую роль. Недостаток места лишает нас возможности рассмотреть здесь многие вторичные биосинтетические пути, ведущие к этим продуктам. Однако на двух примерах мы все же считаем необходимым остановиться. Один из них касается синтеза креатина, соединения, которое в форме фосфокреатина (разд. 14.15) играет важную роль в биоэнергетике мышечной и нервной тканей. В его образовании участвуют три аминокислоты: глицин, аргинин и метионин (рис. 22-11).

Второй пример — это биосинтез порфиринов, главным предшественником которых тоже является глицин. Процесс этот заслуживает особого внимания в связи с той важной ролью, которую порфириновое ядро играет в гемопротеинах, т. е. в гемоглобине и цитохромах,

а также в Mg^{2+}-содержащем производном порфирина – *хлорофилле*. Порфирины построены из четырех молекул монопиррольного производного – *порфобилиногена*; путь синтеза порфобилиногена показан на рис. 22-12. Этот путь выяснен главным образом в исследованиях с использованием радиоактивных изотопов, проведенных Давидом Шемином. На первой стадии глицин взаимодействует с сукцинил-СоА, что приводит к образованию *α-амино-β-кетоадипиновой кислоты*, которая затем декарбоксилируется с образованием *δ-аминолевулиновой кислоты* и двуокиси углерода. Две молекулы δ-аминолевулиновой кислоты конденсируются, что приводит к образованию порфобилиногена. Из четырех молекул порфобилиногена в результате ряда сложных ферментативных реакций образуется *протопорфирин*. Железо включается в уже готовую структуру протопорфирина. На рис. 22-12 показано, какие атомы углерода и азота в молекуле протопорфирина IX происходят из глицина. Биосинтез порфиринов регулируется концентрацией того гемопротеина, например гемоглобина, который является его конечным продуктом; этот конечный продукт ингибирует (по типу обратной связи) одну из первых реакций синтеза порфиринов.

22.11. При некоторых генетических заболеваниях накапливаются производные порфиринов

Генетические дефекты, затрагивающие те или иные ферменты биосинтетического пути, ведущего от глицина к порфиринам, вызывают накопление специфических предшественников порфиринов в эритроцитах, жидкостях тела и в печени. Эти патологические состояния называются *порфириями*. Один из типов порфирии, поражающий главным образом эритроциты, проявляется в накоплении *уропорфириногена I* – аномального изомера одного из предшественников протопорфирина. Моча при этом бывает красной, зубы при облучении ультрафиолетом сильно флуоресцируют, а кожа обнаруживает повышенную чувствительность к солнечным лучам.

Другой тип порфирии сопровождается накоплением в печени предшественника порфирина – порфобилиногена и нейропсихическими расстройствами. Король Георг III, правивший Англией во время войны за независимость в Северной Америке (1776–1781), страдал, как полагают, этим типом порфирии. Специалисты по истории медицины указывают, что именно эмоциональная неустойчивость, являющаяся одним из симптомов данной болезни, обусловила неразумное поведение короля, упрямо настаивавшего на чрезмерных налогах и суровом наказании для американских колоний.

22.12. В результате распада гемогрупп образуются желчные пигменты

Железопорфириновая группа, или гемогруппа гемоглобина, высвобождающегося из эритроцитов, которые разрушаются в селезенке, распадается с обра-

Рис. 22-13. Билирубин – один из желчных пигментов. Он образуется в результате разрыва тетрапиррольного (порфиринового) кольца гемогруппы и превращения его в изображенную здесь линейную структуру. Определение концентрации билирубина в крови служит диагностическим методом при некоторых болезнях печени.

зованием свободного Fe^{3+} и в конечном счете *билирубина* – тетрапиррольного производного с разомкнутым кольцом (рис. 22-13). Билирубин связывается сывороточным альбумином крови и переносится в печень, где он превращается в водорастворимое производное, поступающее в желчь. Билирубин – это тот пигмент, который окрашивает в желтый цвет кожу и белки глаз при желтухе, развивающейся вследствие нарушения функции печени. Определение концентрации билирубина в крови служит диагностическим методом при этом заболевании и других болезнях печени.

22.13. Пуриновые нуклеотиды синтезируются сложным путем

Рассмотрим теперь биосинтез нуклеотидов, в котором аминокислоты играют роль важных предшественников. Почти все живые организмы, за исключением лишь некоторых видов бактерий, обладают способностью синтезировать пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды. Два обычных пуриновых нуклеотида, входящих в состав нуклеиновых кислот, – это *аденозин-5'-монофосфат* (AMP), называемый также *аденилатом*, и *гуанозин-5'-монофосфат* (GMP), или *гуанилат*. В состав этих нуклеотидов входят пуриновые основания – соответственно *аденин* и *гуанин*. Первым важным ключом к расшифровке путей биосинтеза пуриновых нуклеотидов послужили результаты исследований, в которых животным скармливались различные меченые метаболиты, после чего определялось место включения изотопной метки в пуриновое ядро. Такие опыты проводились на птицах; азот у них выводится из организма главным образом в форме *мочевой кислоты* (разд. 19.20), которая является одним из продуктов окисления пуринов и легко может быть выделена в чистом виде из птичьего помета. На рис. 22-14 показано происхождение различных атомов углерода и азота в пуриновом ядре, выявленное в опытах, проведенных на голубях. На рисунке видно, что каждый из четырех атомов азота в молекуле пурина происходит от одной из аминокислот.

Хотя можно было бы думать, что при биосинтезе пуриновых нуклеотидов образуется пуриновое ядро, а уже затем к нему присоединяется рибозофосфатная часть молекулы, в действительности синтез начинается с рибозо-5-фосфата, на котором последовательно, в несколько этапов строится пуриновое ядро. Таким образом, на первых этапах этого синтеза de novo образуется ациклический предшественник рибонуклеотида, из которого на последующих этапах после замыкания открытой цепи возникает пуриновый нуклеотид.

Главные стадии процесса, ведущего к образованию AMP и GMP, выясненные американскими биохимиками Джоном Бьюкененом и Дж. Робертом Гринбергом, показаны на рис. 22-15–22-17. Сначала в положение 1 рибозо-5-фосфата переносится аминогруппа от глутамина; этот перенос включает две сложные стадии (рис. 22-15). Затем к новой аминогруппе присоединяется аминокислота глицин. Далее следует еще несколько эта-

Рис. 22-14. Происхождение атомов, образующих пуриновое ядро. Выяснено на основании экспериментов с использованием предшественников, меченных изотопами ^{14}C или ^{15}N.

Рис. 22-15. Превращение D-рибозо-5-фосфата в 5-фосфо-β-D-рибозиламин.

пов, завершающихся замыканием кольца. Таким путем образуется пятичленное имидазольное кольцо пуринового ядра (рис. 22-16). На это кольцо переносится затем аминогруппа от аспартата, после чего происходит замыкание второго кольца, и в результате образуется пуриновое ядро, состоящее из двух конденсированных колец. Первый промежуточный продукт этого биосинтетического пути, содержащий готовое пуриновое ядро, представляет собой *инозиновую кислоту* (рис. 22-16 и 22-17). Для последующего превращения инозиновой кислоты в *адениловую кислоту* (AMP) требуется введение еще одной аминогруппы, донором которой тоже является аспартат; однако это введение аминогруппы происходит довольно сложным путем, который мы здесь рассматривать не будем. Превращение инозиновой кислоты в гуаниловую кислоту (GMP) осуществляется в реакциях, сопровождающихся гидролизом ATP (рис. 22-17). Описанный путь биосинтеза пуриновых нуклеотидов называют синтезом de novo. Позже мы узнаем, что пуриновые нулкеотиды могут синтезироваться также и из готовых продуктов (путем реутилизации пуринов).

AMP фосфорилируется до ADP в реакции, катализируемой *аденилаткиназой* (разд. 14.17)

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP.$$

Образовавшийся ADP фосфорилируется затем до ATP в результате гликолиза или же в результате переноса электронов по дыхательной цепи. За счет ATP образуется сначала GDP, а затем GTP в реакциях. катализируемых соответственно *нуклеозидмонофосфаткиназой* и *нуклеозиддифосфаткиназой*

$$ATP + GMP \rightleftharpoons GDP + ADP,$$

$$ATP + GDP \rightleftharpoons GTP + ADP.$$

Рис. 22-17. Превращение инозиновой кислоты в адениловую и гуаниловую кислоты. На красном фоне показаны изменения в пуриновой кольцевой системе.

5-фосфо-β-D-рибозиламин

Имидазольное кольцо

Пуриновая циклическая система

Инозиновая кислота

Рис. 22-16. Этапы образования пуринового ядра инозиновой кислоты. На красном фоне показаны структуры, возникающие на каждом из этих последовательных ферментативных этапов. R (на сером фоне) означает 5-фосфо-D-рибозильную группу, на которой строится пуриновая кольцевая система.

22.14. Биосинтез пуриновых нуклеотидов регулируется по типу обратной связи

Регуляция общей скорости синтеза пуриновых нуклеотидов de novo и относительных скоростей образования двух конечных продуктов, адениловой кислоты и гуаниловой кислоты, осуществляется при участии трех главных регуляторных механизмов, действующих по типу обратной связи (рис. 22-18). Первый из этих механизмов контролирует раннюю стадию, свойственную только этому биосинтетическому пути, а именно стадию переноса аминогруппы на *5-фосфорибозил-1-пирофосфат* (ФРПР) с образованием *5-фосфорибозиламина (рис. 22-15)*. Эту реакцию катализирует аллостерический фермент, ингибируемый конечными продуктами данной последовательности реакций AMP и GMP. Поэтому всякий раз, как AMP и GMP накапливаются в избытке, первая стадия их биосинтеза из ФРПФ тормозится.

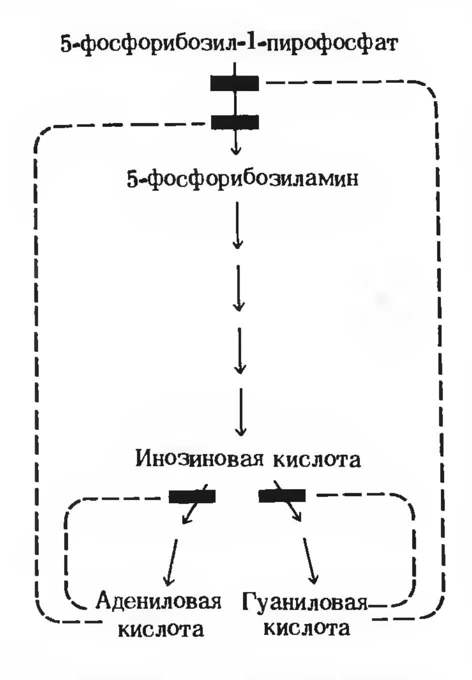


Рис. 22-18. Механизмы, регулирующие биосинтез адениовых и гуаниовых нуклеотидов у *E. coli* по типу обратной связи. У других организмов эти биосинтетические пути регулируются иначе.

Второй регуляторный механизм действует на одной из более поздних стадий (рис. 22-18); в этом случае избыток GMP в клетке вызывает аллостерическое ингибирование процесса образования GMP из инозиновой кислоты, но не влияет на синтез AMP (рис. 22-18). И наоборот, когда действует третий регуляторный механизм, накопление адениловой кислоты подавляет ее образование, но не затрагивает синтез GMP.

22.15. Пиримидиновые нуклеотиды синтезируются из аспартата и рибозофосфата

Обычные пиримидиновые нуклеотиды – это *цитидин-5'-монофосфат* (CMP), или *цитидилат*, и *уридин-5'-монофосфат* (UMP), или *уридилат*; в их состав входят пиримидиновые основания – соответственно *цитозин* и *урацил*. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов (рис. 22-19) несколько отличается от синтеза пуриновых нуклеотидов; в этом случае сначала образуется шестичленное пиримидиновое кольцо, а затем к нему присоединяется рибозофосфат. Для этого процесса требуется *карбамоилфосфат*, играющий роль промежуточного продукта также и в цикле мочевины (разд. 19.7). Однако карбамоилфосфат, необходимый для синтеза мочевины, образуется в митохондриях при участии митохондриального фермента *карбамоилфосфат-синтетазы* I, а карбамоилфосфат, участвующий в биосинтезе пиримидинов, образуется в цитозоле под действием другой формы того же фермента – *карбамоилфосфат-синтетазы* II. Цитозольный карбамоилфосфат взаимодействует с аспартатом, в результате чего получается *N-карбамоиласпартат*. Эта реакция катализируется *аспартат-транскарбамоилазой*, одним из наиболее тщательно изученных аллостерических ферментов (дополнение 9-5); о ней мы еще будем говорить ниже. При отщеплении молекулы воды от N-карбамоиласпартата под действием *дигидрооротазы* пиримидиновое кольцо замыкается; в результате возникает L-*дигидрооротат*, который затем окисляется с образованием

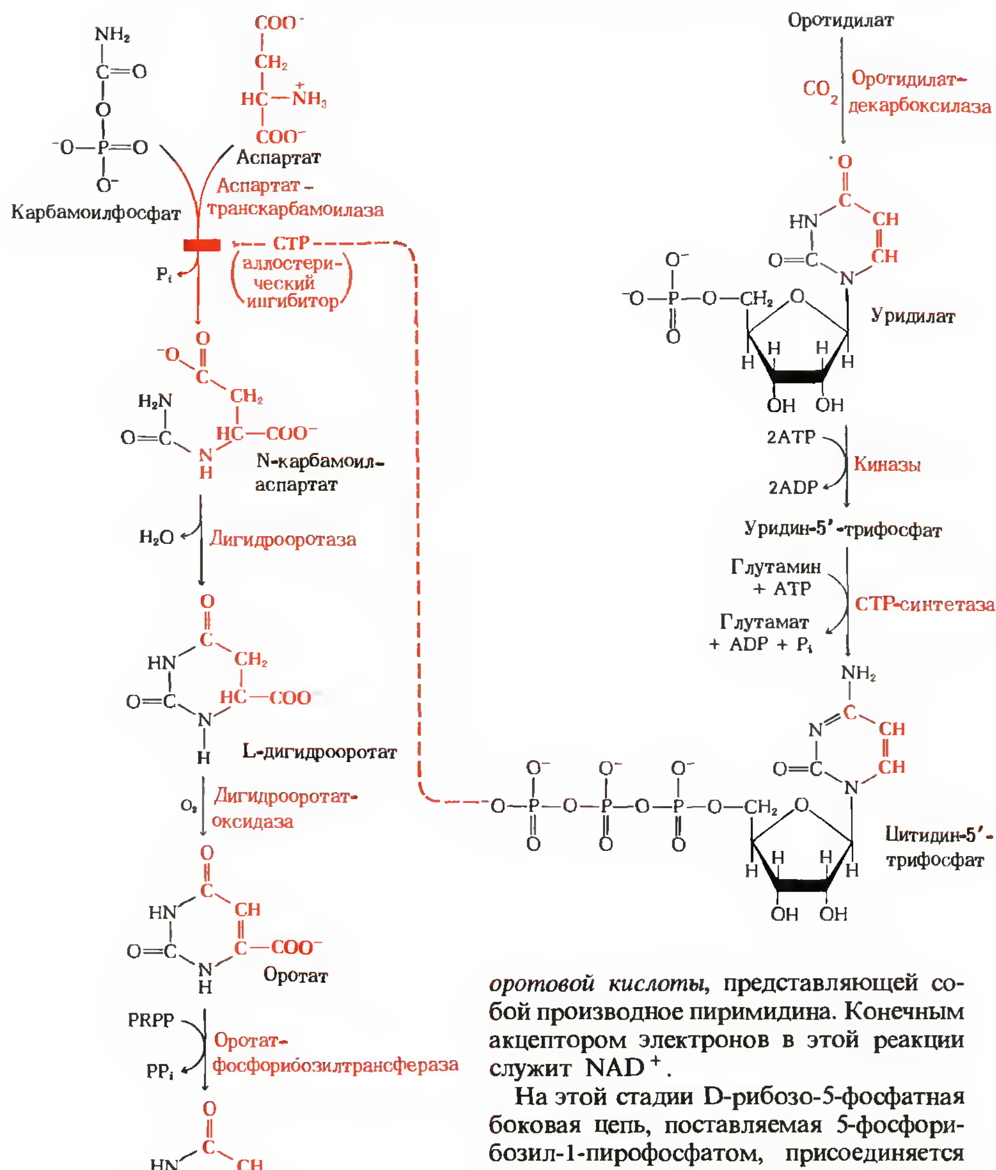


Рис. 22-19. Путь биосинтеза UTP и CTP (через образование оротидиловой кислоты). PRPP – 5'-фосфорибозил-1-пирофосфат.

оротовой кислоты, представляющей собой производное пиримидина. Конечным акцептором электронов в этой реакции служит NAD^+.

На этой стадии D-рибозо-5-фосфатная боковая цепь, поставляемая 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом, присоединяется к оротату, в результате чего образуется *оротидиловая кислота*. Оротидилат декарбоксилируется и образовавшийся *уридилат*, фосфорилируясь, превращается в UTP; последний присоединяет аминогруппу от глутамина и превращается в цитидинтрифосфат (CTP) (рис. 22-19).

22.16. Регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов

Скорость биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов регулируется *аспартат-*

транскарбамоилазой (АТКазой), катализирующей первую реакцию этого биосинтетического пути (рис. 22-20). АТКаза ингибируется конечным продуктом данной последовательности реакций – цитидинтрифосфатом (CTP). Молекула АТКазы состоит из шести каталитических и шести регуляторных субъединиц (дополнение 9-5). Каталитические субъединицы связывают молекулы субстрата, а регуляторные субъединицы – молекулы аллостерического ингибитора CTP. Вся ферментная молекула в целом, так же как и отдельные субъединицы фермента, существует в двух формах – активной и неактивной. Фермент обладает максимальной активностью, когда его регуляторные субъединицы свободны. Однако, когда CTP накапливается, он присоединяется к регуляторным субъединицам и изменяет их конформацию. Это изменение передается каталитическим субъединицам, которые при этом также переходят в неактивную конформацию. ATP препятствует такому действию CTP. На рис. 22-21 показано, как изменяется активность АТКазы под действием аллостерических регуляторов.

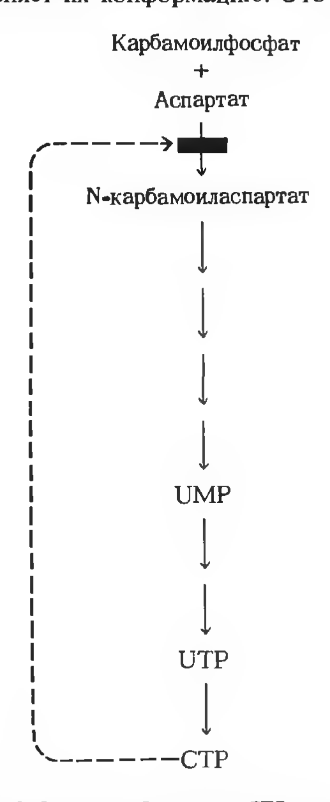


Рис. 22-20. Регуляция биосинтеза CTP путем ингибирования аспартат-транскарбамоилазы конечным продуктом этой последовательности реакций. ATP предотвращает ингибирующее действие CTP.

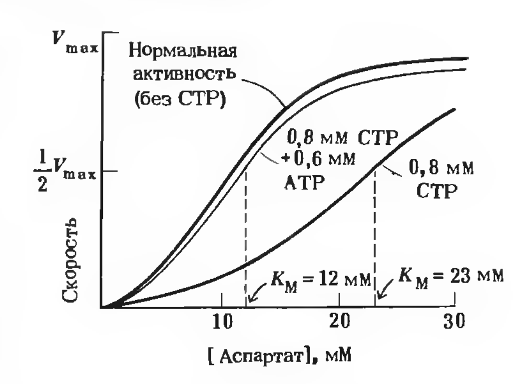


Рис. 22-21. Влияние аллостерических модуляторов CTP и ATP на скорость превращения аспартата в карбамоиласпартат под действием аспартат-транскарбамоилазы. Обратите внимание, что при добавлении CTP (аллостерического ингибитора аспартат-транскарбамоилазы) K_M для аспартата увеличивается. ATP полностью снимает этот эффект.

22.17. Рибонуклеотиды служат предшественниками дезоксирибонуклеотидов

Строительные блоки ДНК, дезоксирибонуклеотиды, образуются из соответствующих рибонуклеотидов в реакциях, в которых D-рибозная часть молекулы рибонуклеотида восстанавливается по атому углерода в положении 2′ с образованием 2′-дезоксипроизводного. Таким путем, например, аденозиндифосфат (ADP) восстанавливается в *2′-дезоксиаденозиндифосфат* (dADP), а GDP – в dGDP. Для восстановления D-рибозной части молекулы рибонуклеозиддифосфатов до 2′-дезокси-D-рибозы требуется пара водородных атомов. Эти водородные атомы поступают в конечном счете от NADPH, но в их передаче участвует особый водородпереносящий белок – *тиоредоксин*. В молекуле этого белка имеются две SH-группы, при помощи которых и совершается перенос водо-

родных атомов от NADPH к рибонуклеозиддифосфату. Окисленная, или дисульфидная, форма тиоредоксина восстанавливается за счет NADPH в реакции, катализируемой *тиоредоксинредуктазой* Затем восстановленный тиоредоксин восстанавливает нуклеозиддифосфат (NDP) до дезоксирибонуклеозиддифосфата (dNDP) в реакции, катализируемой *рибонуклеотидредуктазой* (рис. 22-22)

$$NADPH + H^+ + \text{Тиоредоксин}\begin{matrix} S \\ | \\ S \end{matrix} \longrightarrow NADP^+ + \text{Тиоредоксин}\begin{matrix} SH \\ \\ SH \end{matrix}$$

$$\text{Тиоредоксин}\begin{matrix} SH \\ \\ SH \end{matrix} + NDP \longrightarrow \text{Тиоредоксин}\begin{matrix} S \\ | \\ S \end{matrix} + dNDP + H_2O$$

В ДНК содержатся остатки *тимидиловой кислоты* (dTMP) вместо остатков уридиловой кислоты (UMP), присутствующих в РНК (разд. 14.18). Они получаются следующим образом: сначала дезоксиуридиндифосфат (dUDP), образовавшийся из уридиндифосфата (UDP), гидролизуется с образованием dUMP

$$dUDP + H_2O \rightarrow dUMP + P_i,$$

а затем dUMP превращается в дезокситимидилат (dTMP) в результате метилирования при помощи N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата в реакции, катализируемой *тимидилатсинтетазой*

$$dUMP + N^5,N^{10}\text{-метилентетрагидрофолат} \rightarrow dTMP + \text{Дигидрофолат}.$$

dTMP фосфорилируется с образованием dTDP

$$dTMP + ATP \rightarrow dTDP + ADP,$$

а из дигидрофолата под действием *тетрагидрофолатдегидрогеназы* регенерирует тетрагидрофолат

$$\text{Дигидрофолат} + NADPH + H^+ \rightarrow \rightarrow \text{Тетрагидрофолат} + NADP^+.$$

Синтез дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, являющихся непосредственными предшественниками ДНК (гл. 28), завершается в результате следующих реакций, катализируемых соответствующими киназами:

$$ATP + dADP \rightarrow ADP + dATP,$$
$$ATP + dCDP \rightarrow ADP + dCTP,$$
$$ATP + dTDP \rightarrow ADP + dTTP,$$
$$ATP + dGDP \rightarrow ADP + dGTP.$$

Рис. 22-22. Превращение ADP в dADP. Другие рибонуклеозид-5'-дифосфаты (NDP) превращаются в соответствующие 2'-дезоксиформы (dNDP) в результате такой же реакции.

22.18. Распад пуринов приводит у человека к образованию мочевой кислоты

Распад пуриновых нуклеотидов (рис. 22-23) начинается с отщепления фосфатной группы под действием *5'-нуклеотидазы*. Из аденилата таким путем образуется *аденозин*, который, дезаминируясь, превращается в *инозин*. Инозин затем подвергается гидролизу, что приводит к образованию пуринового основания *гипоксантина* и D-рибозы. Гипоксантин окисляется до *ксантина* и далее до *мочевой кислоты* под действием *ксантиноксидазы*, сложного флавинзависимого фермента, в простетической группе которого содержится один атом молибдена и четыре железосерных центра (разд. 17.8). Акцептором водорода в этой сложной реакции служит молекулярный кислород.

Конечным продуктом катаболизма GMP также является *урат*. GMP сначала гидролизуется с образованием нуклеозида *гуанозина*, который, расщепляясь, превращается в свободный *гуанин*. Гуанин претерпевает гидролитическое расщепление с образованием ксантина, превращающегося затем в урат под действием ксантиноксидазы (рис. 22-24).

У приматов мочевая кислота – конечный продукт распада пуринов, выводимый с мочой. Однако у многих других



Рис. 22-23. Пути расщепления пуриновых нуклеотидов. Подробно конечные этапы показаны на рис. 22-24.

Гипоксантин

H_2O, O_2 → H^+, O_2^- Ксантиноксидаза

Ксантин (енольная форма)

H_2O, O_2 → H^+, O_2^- Ксантиноксидаза

Мочевая кислота

$\frac{1}{2}O_2 + H_2O$ → CO_2 Уратоксидаза

Аллантоин

Рис. 22-24. Конечные этапы расщепления пуринов – сложные реакции, катализируемые ксантиноксидазой и уратоксидазой. Ксантиноксидаза ингибируется аллопуринолом (рис. 22-25).

позвоночных мочевая кислота подвергается в организме дальнейшему расщеплению и экскреторным продуктом является у них *аллантоин*, образующийся под действием *уратоксидазы* (рис. 22-24).

Общее количество мочевой кислоты, выводимой с мочой, составляет у здорового взрослого человека около 0,6 г в сутки; образуется она в результате распада пуринов, поступающих в организм с пищей, и при обновлении пуриновых нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот. У человека известен ряд генетических нарушений, затрагивающих обмен пуринов. Некоторые из таких нарушений приводят к серьезным последствиям. Однако, прежде чем о них говорить, мы рассмотрим метаболическую реутилизацию свободных пуринов, т. е. их использование в качестве готовых продуктов для синтеза нуклеотидов.

22.19. Реутилизация пуриновых оснований

Свободные пуриновые и пиримидиновые основания непрерывно образуются в клетках в результате описанного выше метаболического распада нуклеотидов. Значительная часть этих свободных пуриновых оснований не подвергается дальнейшему распаду, а реутилизируется, т. е. используется вновь для синтеза пуриновых нуклеотидов. В этом случае нуклеотиды образуются совсем не так, как при биосинтезе de novo, который мы рассмотрели выше. Пуриновое ядро аденина, синтезирующееся de novo, строится на рибозо-5-фосфате этап за этапом, в длинной последовательности реакций. Путь биосинтеза из готовых продуктов гораздо проще. Он включает всего лишь одну реакцию, в ходе которой свободный аденин взаимодействует с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом (ФРПФ), что и приводит к образованию аденинового нуклеотида

$$\text{Аденин} + \text{ФРПФ} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i.$$

Свободный гуанин реутилизируется тем же путем при помощи другого фермента

$$\text{Гуанин} + \text{ФРПФ} \rightarrow \text{GMP} + \text{PP}_i.$$

Интересно отметить, что этот путь синтеза нуклеотидов из готовых продуктов не только проще их синтеза de novo, но и «дешевле» его, поскольку требует меньшего расхода энергии ATP.

При помощи того же фермента, который участвует в реутилизации гуанина, может реутилизироваться и гипоксантин, представляющий собой продукт дезаминирования аденина. В этом случае образуется инозиновая кислота (IMP)

$$\text{Гипоксантин} + \text{ФРПФ} \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{IMP} + \text{PP}_i.$$

Фермент, катализирующий две последние реакции, носит название *гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы*. У детей встречается сцепленный с полом генетический дефект, при котором данный фермент отсутствует. Такого рода ферментная недостаточность (встречающаяся только у мальчиков) приводит к тяжелым и крайне необычным последствиям. Она проявляется (как правило, в двухлетнем возрасте) своеобразным комплексом патологических симптомов, который называется *синдромом Леша–Нихана* в честь студента-медика Майкла Леша и педиатра Уильяма Нихана из Медицинской школы Джона Гопкинса, открывших это патологическое состояние в результате интересных биохимических исследований и описавших его в 1964 г. Дети с таким генетическим дефектом страдают умственной отсталостью и нарушением координации движений. Кроме того, они крайне агрессивны. Более того, эта их агрессивность часто обращается и на них самих: они легко могут искалечить себя, кусая себе губы и пальцы на руках и ногах.

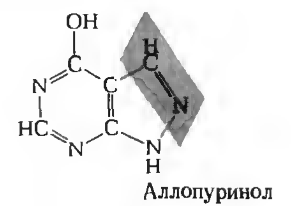
Болезнь Леша–Нихана представляется удивительной и с метаболической точки зрения. Выше мы говорили о том, что есть два пути синтеза пуриновых нуклеотидов – путь синтеза de novo, при котором кольцевая система пуринов строится поэтапно, и путь синтеза из готовых продуктов, т. е. простая сборка пуриновых нуклеотидов из свободных пуринов и ФРПФ. При болезни Леша–Нихана путь синтеза из готовых продуктов не

функционирует, но синтез de novo идет и пуриновые нуклеотиды образуются. Оказывается, осложнения возникают не из-за недостатка пуриновых нуклеотидов, а, наоборот, из-за их «перепроизводства» вследствие нарушения в каком-то еще не известном регуляторном механизме. Избыток пуриновых нуклеотидов вызывает чрезмерное накопление мочевой кислоты и ФРПФ. Почему так сильно извращает поведение ребенка этот дефект, затрагивающий, казалось бы, второстепенный метаболический путь, мы пока не знаем. Жертвам болезни Леша–Нихана в настоящее время мало чем можно помочь. Методами генетической инженерии удается только «излечивать» in vitro клетки, взятые от таких больных (гл. 30).

22.20. Избыточное образование мочевой кислоты вызывает подагру

Подагра, которую долгое время ошибочно считали «болезнью гурманов», вызывается повышенным содержанием мочевой кислоты в сыворотке крови и в тканях. Это болезнь суставов, поражающая преимущественно мужчин. Приступы подагрического артрита, характеризующиеся острыми болями, а также покраснением и припухлостью в области суставов, обусловливаются обильными отложениями уратов (кристаллов мочекислого натрия). Поражаются также и почки, потому что избыток уратов откладывается в почечных канальцах. Истинная причина подагры до сих пор не известна; полагают, что такой причиной может быть наследственная частичная недостаточность какого-либо из ферментов, участвующих в обмене пуринов.

Эффективное лечение подагры достигается путем сочетания соответствующей диеты с лекарственной терапией. Исключаются из рациона продукты с высоким содержанием нуклеотидов и нуклеиновых кислот, например печенка, а также кофе и чай, в которых содержатся пурины *кофеин* и *теобромин*. Хороший эффект дает применение аллопуринола; этот препарат является ингибитором ксантиноксидазы – фермента, ответственного за



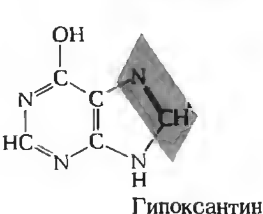


Рис. 22-25. Аллопуринол – ингибитор ксантиноксидазы. В результате небольшого изменения (показано на красном фоне) в структуре гипоксантина (субстрата фермента) получается мощный ингибитор фермента, обладающий лечебным действием. Аллопуринол, эффективный лекарственный препарат, был создан именно как конкурентный ингибитор ксантиноксидазы.

превращение пуринов в мочевую кислоту (рис. 22-25).

22.21. Круговорот азота

Азот требуется для биосинтеза и аминокислот, и нуклеотидов. В природе, однако, встречается мало растворимых соединений азота в биологически доступной форме. Поэтому большинство организмов использует аммиак, аминокислоты и нуклеотиды экономно, тем более что все эти соединения являются предшественниками важнейших биомолекул – нуклеиновых кислот и белков. Действительно, как мы уже знаем, свободные аминокислоты, пурины и пиримидины, образующиеся в процессе метаболического обновления, часто вновь идут в дело, т.е. используются повторно.

Больше всего азота содержится в воздухе, который почти на 80% состоит из молекулярного азота (N_2). Однако переводить атмосферный азот в формы, доступные для живых организмов, могут лишь сравнительно немногие виды; именно они и обеспечивают сохранение и реутилизацию биологически доступного азота в гигантском *круговороте азота*, совершающемся в природе (рис. 22-26).

Первым этапом круговорота азота является *фиксация* атмосферного азота азотфиксирующими организмами с образованием аммиака. Аммиак могут использовать почти все живые организмы. Существуют, однако, некоторые важные виды почвенных бактерий, добывающие необходимую им энергию за счет окисления аммиака до нитритов и в конце концов до нитратов. Эти бактерии вездесущи и чрезвычайно активны, а потому почти весь попадающий в почву аммиак в конечном счете окисляется до нитратов. Этот процесс носит название *нитрификации*. Растения и многие виды бактерий при помощи *нитратредуктазы* вновь легко восстанавливают нитраты до аммиака. Из образовавшегося таким путем аммиака растения синтезируют аминокислоты, а животные, питающиеся растениями, используют эти аминокислоты (как заменимые, так и незаменимые) для построения своих белков. После смерти животных их трупы подвергаются микробному разложению. Аммиак, выделяющийся при распаде белков, возвращается в почву, и нитрифицирующие бактерии превращают его здесь снова в нитриты (NO_2^-) и нитраты NO_3^-.



Рис. 22-26. Круговорот азота. Общее количество азота, ежегодно связываемого биосферой, превышает 10^{11} кг.

Рассмотрим теперь процесс фиксации азота, который важен для всех форм жизни.

22.22. Способность фиксировать атмосферный азот присуща немногим организмам

Лишь сравнительно немногие виды микроорганизмов и растений обладают способностью фиксировать атмосферный азот. К таким организмам относятся некоторые свободно живущие бактерии, например цианобактерии (сине-зеленые водоросли), обитающие не только в пресных и соленых водах, но и в почве, а также ряд почвенных бактерий, в частности *Azotobacter*. Первым важным продуктом фиксации азота у этих организмов является аммиак (NH_3), который может использоваться другими формами жизни либо непосредственно, либо после его превращения в такие растворимые соединения, как нитриты, нитраты и аминокислоты.

Иной способ фиксации азота свойствен растениям семейства бобовых, к которому относятся горох, фасоль, клевер и люцерна. Этот способ фиксации – его называют *симбиотической* азотфиксацией – основан на взаимодействии растения-хозяина с бактериями-симбионтами, обитающими в его корневых клубеньках. Ферменты, участвующие в фиксации азота, принадлежат клубеньковым бактериям, но и растение в свою очередь поставляет для этого процесса некоторые необходимые компоненты, которые у бактерий отсутствуют (рис. 22–27). Наряду с бобовыми способностью фиксировать атмосферный азот обладают и некоторые другие виды растений; однако подавляющее большинство небобовых растений и все виды животных такой способности лишены.

Насколько важен азот для жизни, видно уже из того, что почти всем культурным растениям для оптимального роста требуется больше растворимых соединений азота, чем содержится в почве. Мы можем снабжать их азотом в виде «естественных» удобрений, таких, как навоз или гуано (разд. 19.20), или вносить



Рис. 22-27. Корневые клубеньки одного из бобовых растений (*Lotus corniculatus*), в которых идет процесс фиксации азота. Осуществляющие фиксацию азота бактерии-симбионты образуют большие скопления, тесно связанные с клетками корня. Эти клетки поставляют бактериям некоторые факторы, необходимые для фиксации азота, в частности леггемоглобин, обладающий очень высоким сродством к кислороду. Кислород – мощный ингибитор нитрогеназы.

в почву химические удобрения, например аммиачную селитру (NH_4NO_3). Другой способ обеспечения культурных растений необходимым азотом – это севооборот. Без внесения азотных удобрений кукуруза может расти на одном и том же поле не более одного или двух сезонов, но если каждые два или три года занимать это поле под горох, фасоль, люцерну или клевер, то эти растения благодаря своей способности к симбиотической азотфиксации будут обогащать почву азотом в количестве, достаточном для того, чтобы на ней могла потом расти кукуруза.

22.23. Фиксация азота – сложный ферментативный процесс

В фиксации азота роль катализатора играет ферментный комплекс – *нитрогеназная* система, действие которой изучено еще не до конца. Нитрогеназная система нестабильна и быстро инактивируется при соприкосновении с атмосферным кислородом; поэтому ее трудно выделить в активной форме и она плохо поддается очистке. Первым стабильным продуктом фиксации азота считается аммиак (NH_3). Таким образом, весь процесс в целом сводится, как полагают, к восстановлению молекулярного азота (N_2) до двух молекул аммиака

$$N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$$

$$\Delta G^{0\prime} = -8{,}0 \text{ ккал/моль.}$$

Поскольку изменение стандартной свободной энергии при этой реакции выражается большой отрицательной величиной, реакция при стандартных условиях должна идти слева направо. Однако молекулярный азот – довольно инертный газ, и два его атома соединены очень прочной связью, так что для его восстановления в аммиак требуется очень большая энергия активации. Нитрогеназная система преодолевает этот активационный барьер (разд. 9.4) каким-то нам пока не известным способом.

Донором водорода для нитрогеназного комплекса является в конечном счете NADPH. Сначала восстановительные эквиваленты передаются от NADPH на *ферредоксин*. Этот белок, содержащий железо и серу, служит непосредственным донором восстановительных эквивалентов при восстановлении азота. В состав его молекулы входят семь атомов железа и такое же число атомов кислотолабильной серы. Молекулярная масса ферредоксина равна 6000. От ферредоксина восстановительные эквиваленты передаются нитрогеназному комплексу, который состоит из двух металлсодержащих ферментов: в состав одного из них входит железо, а в состав другого – железо и молибден (рис. 22-28). Для фиксации

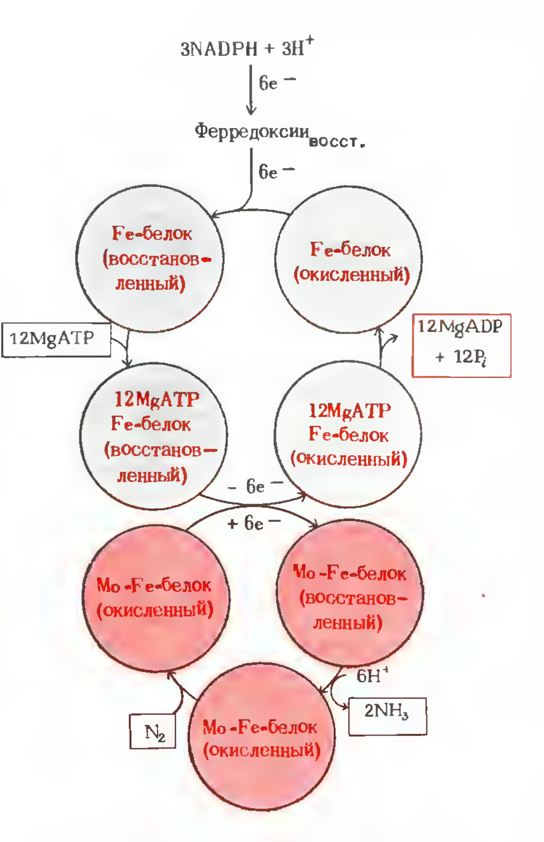


Рис. 22-28. Гипотетический ход нитрогеназной реакции. Предполагается, что в активных центрах этих ферментов протекает ряд промежуточных этапов процесса.

азота требуется также ATP, гидролизующийся до ADP и фосфата. Точное назначение этого ATP неизвестно, поскольку никаких фосфорилированных промежуточных продуктов обнаружить не удалось. Предполагается, что свободная энергия гидролиза ATP помогает преодолеть высокий активационный барьер. Вполне вероятно, что на каждую молекулу N_2, восстановленную до двух ионов NH_4^+, гидролизуются 12 молекул ATP до ADP и P_i. Если это так, то суммарное уравнение фиксации азота имеет вид

$$N_2 + 3NADPH + 5H^+ + 12ATP + 12H_2O \rightarrow 2NH_4^+ + 3NADP^+ + 12ADP + 12P_i.$$

Нитрогеназная система обладает одним интересным свойством, которое делает возможным количественное изучение фиксации азота в интактных растениях. Нитрогеназа катализирует не только восстановление N_2, но и восстановление *ацетилена* ($HC{\equiv}CH$) до *этилена* ($H_2C{=}CH_2$). Поскольку соотношение этилена и ацетилена в атмосфере можно измерить физическими методами, имеется возможность определять активность нитрогеназы в любых системах растение–почва в экспериментальной теплице, вводя в газовую фазу ацетилен и измеряя скорость образования этилена.

Изучению нитрогеназной системы посвящено очень большое число экспериментальных исследований, что следует объяснить ее огромным практическим значением. В промышленности аммиак для удобрений получают путем каталитического восстановления атмосферного азота по способу, предложенному Габером. Эта реакция

$$N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$$

требует очень высокой температуры и высокого давления. Если бы удалось воспроизвести нитрогеназную реакцию, используя более простой набор дешевых катализаторов, то это дало бы возможность организовать сравнительно недорогое производство таких удобрений, как растворимые аммониевые соли, что особенно важно для развивающихся стран, которым энергоемкий процесс Габера не по средствам.

Испытываются также и биологические подходы, с помощью которых можно было бы сделать атмосферный азот более доступным. Была, например, предпринята попытка определить, нельзя ли заселить различными видами азотфиксирующих бактерий или какими-нибудь их мутантами обычные небобовые культурные растения, в частности кукурузу, и таким путем создать новые полезные симбиотические ассоциации. Попутно обнаружилось, что в корнях ряда небобовых растений тропических стран тоже обитают азотфиксирующие бактерии. К сожалению, таким растениям для фиксации азота требуется очень теплая поч-

ва; если выращивать их в умеренной зоне, то фиксации азота не происходит.

Другой подход заключается в том, чтобы выделить бактериальную ДНК, кодирующую нитрогеназную систему, и ввести ее в геном микроорганизмов, не имеющих нитрогеназы, или в геном растений. Такой перенос генов из азотфиксирующих бактерий в нефиксирующие, в частности в *E. coli*, удалось осуществить. Гораздо труднее добиться включения нитрогеназной ДНК в геном высших растений и заставить ее в этом геноме «работать». Однако методы генетической инженерии постепенно совершенствуются, а значит, и эту задачу со временем, быть может, удастся решить.

Краткое содержание главы

В организме человека и белой крысы синтезируются 10 или 20 аминокислот, входящих в состав белков. Остальные аминокислоты, которые должны поступать с пищей и потому называются незаменимыми, синтезируются растениями и бактериями. Аминокислоты, объединяемые под названием «заменимых», образуются различными путями. Глутамат получается в результате восстановительного аминирования α-кетоглутарата. Сам глутамат служит предшественником глутамина и пролина. Аланин и аспарат образуются путем трансаминирования соответственно из пирувата и оксалоацетата. Тирозин получается в результате гидроксилирования фенилаланина, принадлежащего к числу незаменимых аминокислот. Цистеин синтезируется из метионина и серина в сложной последовательности реакций, в которой промежуточными продуктами служат S-аденозилметионин и цистатионин. Углеродный скелет серина происходит от 3-фосфоглицерата. Серин является предшественником глицина; β-углеродный атом серина переносится на тетрагидрофолат. Пути биосинтеза незаменимых аминокислот у растений и у бактерий более сложны и длинны. Они образуются из некоторых заменимых аминокислот, а также из других метаболитов. Аллостерическая регуляция биосинтетических путей, приводящих к аминокислотам, осуществляется по типу обратной связи; регуляторным ферментом, который ингибируется конечным продуктом, образующимся в данной последовательности реакций, служит обычно фермент, катализирующий первую реакцию. Аминокислоты являются предшественниками многих других важных биомолекул. Порфириновое кольцо гемопротеинов происходит из глицина и сукцинил-СоА.

Кольцевая система пуринов, входящих в состав пуриновых нуклеотидов, строится поэтапно на 1-м углеродном атоме 5-фосфорибозиламина. Все атомы азота, содержащиеся в пуринах, поступают от аминокислот. После двух этапов, на каждом из которых происходит замыкание кольца, возникает пуриновое ядро. Пиримидины синтезируются из аспарагиновой кислоты, CO_2 и аммиака. Присоединение к ним рибозо-5-фосфата приводит к образованию пиримидиновых рибонуклеотидов. Образующиеся при распаде нуклеотидов свободные пурины сохраняются и вновь используются для синтеза нуклеотидов. Для такой их реутилизации существует особый путь. Генетически обусловленный дефект в одном из ферментов этого пути вызывает болезнь, сопровождающуюся весьма необычными симптомами; она называется болезнью Леша – Нихана. Другая генетическая болезнь, подагра, приводит к отложению кристаллов мочевой кислоты в суставах.

Некоторые почвенные бактерии и бактерии, обитающие в корневых клубеньках бобовых, обладают способностью фиксировать атмосферный азот при помощи сложной нитрогеназной системы. Круговорот азота в природе представляет собой результат четырех процессов: образования аммиака путем связывания молекулярного азота в корневых клубеньках бобовых; нитрификации аммиака, осуществляемой почвенными организмами, т. е. превращения его в нитраты; ассимиляции нитратов высшими растениями, приводящей к образованию аммиака; и, наконец, синтеза аминокислот из аммиака в организме растений и животных.

ЛИТЕРАТУРА

Пути биосинтеза аминокислот

Bender D. A. Amino Acid Metabolism, Wiley, New York, 1975.

Blakley R. L. The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, North-Holland, Amsterdam, 1969.

Cunningham E. B. Biochemistry: Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, New York, 1978. Превосходное описание ферментативных стадий.

Meister A. Biochemistry of Amino Acids, 2d ed., Academic, New York, 1965. (Имеется перевод 1-го изд.: Майстер А. Биохимия аминокислот.– М.: ИЛ, 1961.) Этот двухтомный труд представляет собой прекрасный справочник.

Umbarger H. E, Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation, Annu. Rev. Biochem., **47**, 533–606 (1978). Завершающий обзор; автор его был одним из первых исследователей регуляции этих биосинтетических путей.

Генетические нарушения обмена аминокислот и нуклеотидов

Nyhan W. L.(ed.). Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism, Wiley, New York, 1974.

Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1978. Особенно хороши статьи, посвященные подагре и болезни Леша–Нихана.

Фиксация азота

Brill W. J. Biological Nitrogen Fixation, Sci. Am., **236**, 68–81, March (1977).

Delwiche C. C. The Nitrogen Cycle, Sci. Am., **223**, 136–147, September (1970).

Jones T. Nitrogen Fixation and Bioenergetics: The Role of ATP in Nitrogenase Catalysis, FEBS Lett., **98**, 1–8 (1979).

Mortenson L. E., Thorneley R. N. F. Structure and Function of Nitrogenase, Annu. Rev. Biochem., **48**, 387–418 (1979).

Обмен гемогрупп

Granick S., Beale S. I. Hemes, Chlorophyll, and Related Compounds: Biosynthesis and Metabolic Regulation, Adv. Enzymol., **40**, 33–203 (1978).

Обмен нуклеотидов

Henderson J. F., Paterson A. R. P. Nucleotide Metabolism: An Introduction, Academic, New York, 1973.

Jones M. E. Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis in Animals, Annu. Rev. Biochem., **49**, 253–279 (1980).

Вопросы и задачи

1. *Особенности диеты при наличии дефектной фенилаланин-гидроксилазы* (фенилаланин—4-монооксигеназы). Для здоровых людей тирозин является заменимой аминокислотой, но дети с генетическим дефектом, затрагивающим фенилаланин-гидроксилазу, для нормального роста должны получать тирозин с пищей. Объясните, почему это так.
2. *Уравнение, описывающее синтез аспартата из глюкозы.* Напишите суммарное уравнение для синтеза заменимой аминокислоты аспартата из глюкозы, двуокиси углерода и аммиака.
3. *Подавление синтеза нуклеотидов азасерином.* Диазосоединение *O*-(2-диазоацетил)-L-серин, называемое также азасерином, является мощным ингибитором тех ферментов, которые в процессе биосинтеза переносят аминогруппы от глутамина на какой-либо акцептор (т. е. амидотрансфераз). Какой промежуточный продукт будет накапливаться на пути, ведущем от α-D-рибозо-5-фосфата к инозиновой кислоте, если клетки, активно синтезирующие пурины, обработать азасерином? Аргументируйте свой ответ.

$$N\equiv N^{+}-CH_2-C(=O)-O-CH_2-CH(\overset{+}{N}H_3)-COO^-$$

O-(2-диазоацетил)-L-серин (азасерин)

4. *Биосинтез нуклеотидов у ауксотрофных бактерий, лишенных способности синтезировать определенные аминокислоты.* Нормальные клетки *E. coli* синтезируют все аминокислоты, но некоторым ауксотрофным мутантам, не способным к синтезу определенных аминокислот, для оптимального роста необходимо вводить эти аминокислоты в питательную среду. Аминокислоты нужны не только для синтеза белков; некоторые из них требуются для биосинтеза других азотсодержащих клеточных компонентов. Допустим, у нас

имеются три ауксотрофных мутанта, лишенных способности синтезировать одну из трех аминокислот – глицин, глутамин или аспартат. Синтез каких азотсодержащих продуктов (помимо белков) будет нарушен у каждого из этих мутантов?

5. *Противоопухолевые средства. Блокирование синтеза дезокситимидилата.*

а) Дезоксиуридинмонофосфат (dUMP) превращается в дезокситимидинмонофосфат (dTMP), необходимый для синтеза ДНК, путем метилирования N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолатом в реакции, катализируемой тимидилат-синтазой (разд. 22.17)

dUMP —(Тимидилат-синтаза)→ dTMP - - - - → ДНК
N^5, N^{10}-метилен-тетрагидрофолат → Дигидрофолат
Дигидрофолат —(Дигидрофолатредуктаза; NADPH + H^+ → $NADP^+$)→ Тетрагидрофолат → N^5, N^{10}-метилен-тетрагидрофолат

Производное уридина, фторурацил, превращается в клетке во фтордезоксиуридилат (F-dUMP) – мощный необратимый ингибитор тимидилат-синтазы. Как вы объясните тот факт, что фторурацил подавляет рост быстро делящихся раковых клеток у экспериментальных животных?

Фторурацил

б) Дигидрофолат, образующийся в тимидилатсинтазной реакции, вновь превращается в тетрагидрофолат под действием дигидрофолатредуктазы. Каким образом тетрагидрофолат превращается в N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолат? Дигидрофолатредуктаза эффективно ингибируется ($K_i = 10^{-9}$ М) лекарственным препаратом метотрексатом, применяемым в химиотерапии опухолей

Метотрексат

Каким образом этот препарат подавляет рост раковых клеток? Можно ли ожидать, что он будет подавлять также и рост нормальных клеток?

6. *Нуклеотиды – плохой источник энергии.* У большинства организмов нуклеотиды не используются как топливо, т.е. как источник энергии. Какими наблюдениями подкрепляется этот вывод? Почему нуклеотиды являются относительно плохим источником энергии у млекопитающих?

7. *Механизм действия сульфаниламидных препаратов.* Некоторым бактериям для нормального роста требуется *п*-аминобензойная кислота, которую вводят в питательную среду. Рост таких бактерий резко подавляется при добавлении к среде стрептоцида, одного из первых антибактериальных сульфаниламидных препаратов. Кроме того, в присутствии стрептоцида в среде накапливается 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимидазол.

п-Аминобензойная кислота

Стрептоцид

5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимидазол

Оба этих эффекта обратимы: их можно устранить, добавив к среде избыток *п*-аминобензойной кислоты.

а) Какова роль *п*-аминобензойной кислоты? (Подсказка: см. рис. 22-7 и разд. 10.10.)

б) Почему в присутствии стрептоцида накапливается 5'-фосфорибозил-4-кар-

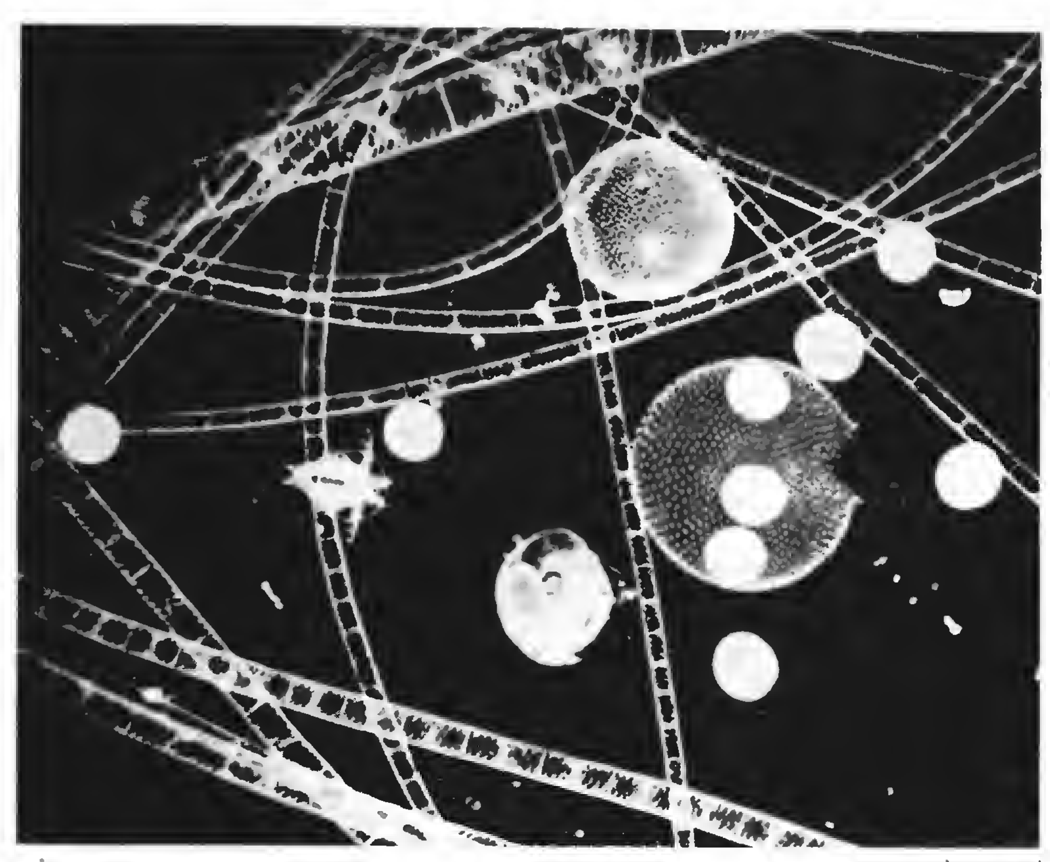
боксамид-5-аминоимидазол? (См. рис. 22-16.)

в) Почему добавление избытка *n*-аминобензойной кислоты снимает и подавление роста бактерий, и накопление 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимидазола?

8. *Лечение подагры.* Аллопуринол (рис. 22-25), ингибитор ксантиноксидазы, используется для лечения хронической подагры. Какова биологическая основа такого лечения? У больных, получавших аллопуринол, иногда образуются ксантиновые камни. Однако мочевыводящие пути страдают от таких конкрементов гораздо реже, чем от нелечеиой подагры. Объясните это наблюдение исходя из следующих данных, характеризующих растворимость указанных соединений в моче: мочевая кислота – 0,15 г/л, ксантин – 0,05 г/л и гипоксантин – 1,4 г/л.

9. *Потребление ATP корневыми клубеньками бобовых.* Бактерии, обитающие в корневых клубеньках растения гороха, потребляют свыше 20% всего ATP, образуемого этим растением. Назовите причину, которой можно было бы объяснить, почему эти бактерии потребляют так много ATP.

10. *Путь атомов углерода в биосинтезе пиримидинов.* В каком положении обнаружится ^{14}C в оротате, если выращивать клетки в присутствии небольщого количества равномерно меченного ^{14}C-сукцината? Дайте аргументированный ответ.



Две фотосинтезирующие водоросли (обитатели пресных вод). Длинные нити – это *Spirogyra* – цепочки фотосинтезирующих клеток, в которых хлоропласты имеют форму ленты, свернутой в спираль. Крупные сферические образования – *Volrox*. Каждый такой шар представляет собой колонию, состоящую из сотен клеток. Большой шар справа только что лопнул, и из него выходят наружу дочерние колонии. В центре фотографии виден очень маленький веслоногий рачок. На рис. 23-2 показаны некоторые другие фотосинтезирующие клетки. Вклад морских и пресноводных микроорганизмов в фотосинтез больше вклада наземных растений.

ГЛАВА 23

ФОТОСИНТЕЗ

Теперь мы обратимся к процессу, который служит в конечном счете источником почти всей биологической энергии, т.е. к процессу улавливания солнечной энергии фотосинтезирующими организмами и превращению ее в энергию биомассы. Фотосинтезирующие и гетеротрофные организмы сосуществуют в биосфере в сбалансированном стационарном состоянии (рис. 23-1). Фотосинтезирующие растения улавливают солнечную энергию и запасают ее в форме ATP и NADPH, которые служат им источником энергии для синтеза углеводов и других органических компонентов клетки из двуокиси углерода и воды; при этом они выделяют в атмосферу кислород. Аэробные гетеротрофы используют этот кислород для расщепления богатых энергией органических продуктов фотосинтеза до CO_2 и H_2O, чтобы генерировать таким путем ATP для своих собственных нужд. Двуокись углерода, образующаяся при дыхании гетеротрофов, возвращается в атмосферу и вновь используется фотосинтезирующими организмами. Солнечная энергия, таким образом, создает движущую силу для круговорота, в процессе которого атмосферная двуокись углерода и атмосферный кислород непрерывно циркулируют, проходя через биосферу (рис. 23-1).

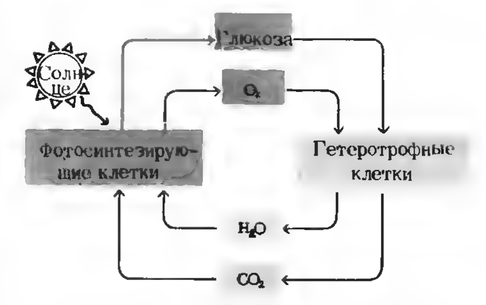


Рис. 23-1. Солнечная энергия – первичный источник всей биологической энергии. Фотосинтезирующие клетки используют энергию солнечного света для образования глюкозы и других органических продуктов. Эти органические продукты служат гетеротрофным клеткам источником энергии и углерода.

В продуктах фотосинтеза запасается огромное количество энергии. Ежегодно растительный мир генерирует за счет запасаемой энергии Солнца не менее 10^{17} ккал свободной энергии, что более чем в 10 раз превышает количество энергии полезных ископаемых, потребляемое за год всем населением Земли. Даже сами эти полезные ископаемые (уголь, нефть и природный газ) тоже есть не что иное, как продукты фотосинтеза, происходившего миллионы лет назад. Именно вследствие этой нашей глобальной зависимости от фотосинтеза (прошлого и нынешнего) как в энергии, так и в пище механизмы фотосинтеза составляют одну из самых фундаментальных биохимических проблем.

23.1. О том, как было выведено уравнение фотосинтеза

Джозеф Пристли, один из тех, кто участвовал в открытии кислорода, провел первые важные опыты по фотосинтезу еще в 1770–1780 гг. Он обнаружил, что

воздух в закрытом сосуде, в котором горит свеча, через некоторое время «портится», так что он уже больше не может поддерживать горение и оказывается непригодным для дыхания – помещенная в сосуд мышь погибает. Если, однако, положить в сосуд веточку мяты, то воздух в нем постепенно «исправляется»: он вновь приобретает способность поддерживать горение свечи и жизнь зверька. Из этих опытов Пристли сделал вывод, что зеленые растения выделяют кислород – процесс, казавшийся противоположным дыханию животных, при котором происходит потребление кислорода. Как ни странно, но в этих своих очень точных наблюдениях Пристли так и не уловил, что для «исправления» воздуха веточкой мяты нужен свет. То, что свет играет важную роль в этом процессе, установил через несколько лет голландский врач Ян Ингенхауз. Он не был профессиональным ученым и занимался наукой скорее как дилетант, проводя опыты в своей домашней лаборатории. Ингенхауз нашел также, что кислород на свету образуют только зеленые части растений.

Позже, в начале XIX в., были проведены первые количественные измерения поглощаемой двуокиси углерода, выделяемого кислорода и растительной массы, образуемой в процессе фотосинтеза. В 1842 г. Роберт Майер, сформулировавший первый закон термодинамики (закон сохранения энергии), опубликовал статью, в которой он утверждал, что источником энергии для образования фотосинтетических продуктов служит солнечный свет. Таким образом, к середине XIX в. стало ясно, что общее уравнение фотосинтеза растений имеет вид

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Свет}} O_2 + \text{Органическое вещество.}$$

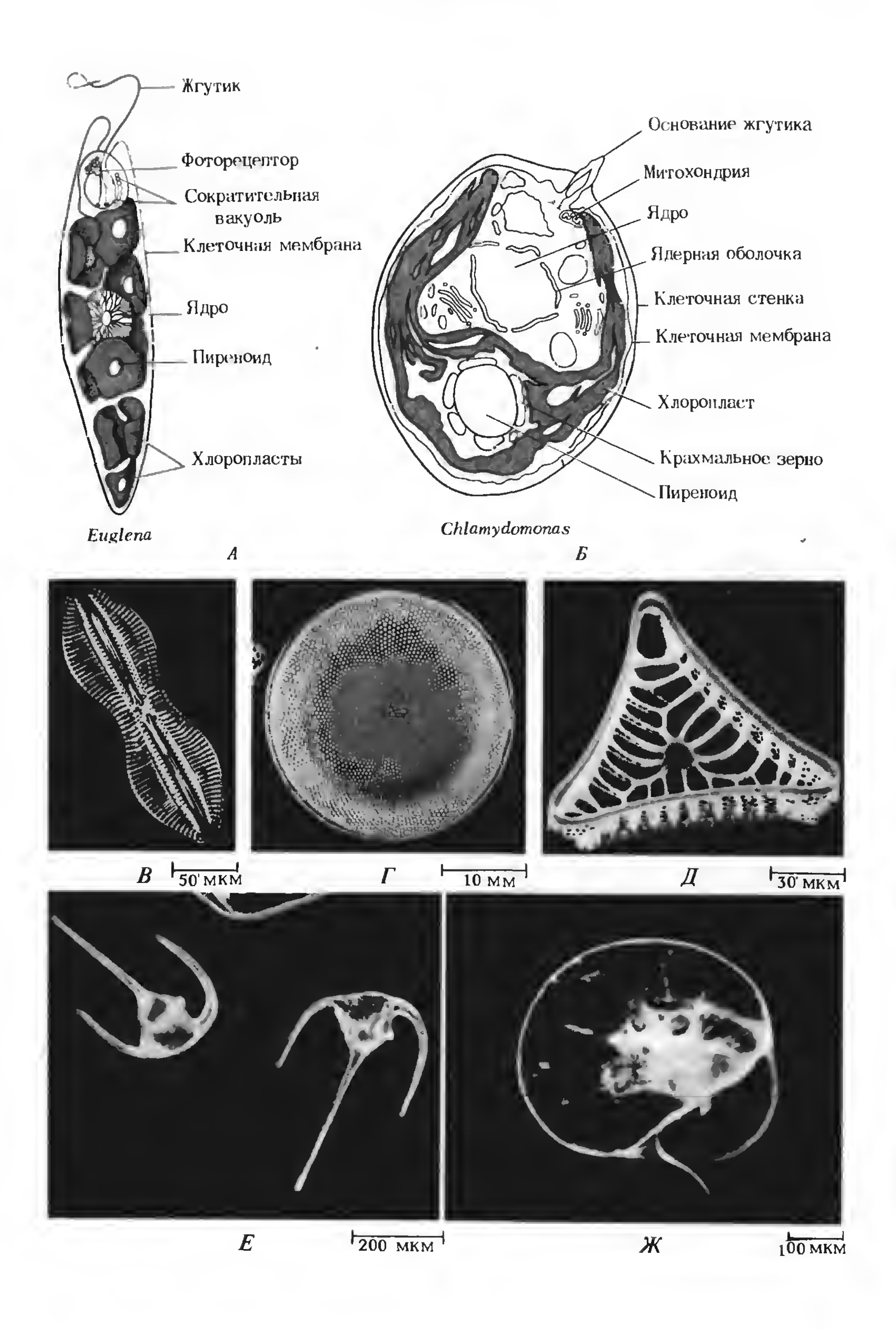
23.2. Фотосинтезирующие организмы чрезвычайно разнообразны

Фотосинтез свойствен не только хорошо нам знакомым зеленым растениям, но и низшим эукариотическим формам, таким, как водоросли, эвгленовые, перидинеи и диатомеи (рис. 23-2), которые не видны невооруженным глазом. Обладают способностью к фотосинтезу и некоторые прокариоты. К фотосинтезирующим прокариотам относятся цианобактерии (сине-зеленые водоросли), зеленые серные бактерии, живущие в горных озерах, и пурпурные серные бактерии, обычные обитатели серных источников. Из всех фотосинтезирующих организмов, пожалуй, наиболее разнообразными потенциями обладают цианобактерии, обитающие как в пресных, так и в соленых водах. Их следует причислить к самым независимым организмам нашей биосферы, поскольку они способны также фиксировать атмосферный азот (разд. 22.22). Не менее половины всего фотосинтеза на Земле протекает в морях, озерах и реках, где его осуществляет множество самых разных микроорганизмов, составляющих фитопланктон.

23.3. Доноры водорода у разных фотосинтезирующих организмов различны

Фотосинтезирующие организмы можно подразделить на два класса: образующие кислород и не образующие его. Зеленые клетки листьев высших растений принадлежат к продуцентам кислорода.

Рис. 23-2. Фотосинтезирующие организмы планктона. *А* и *Б*. Два типичных представителя пресноводных организмов – *Euglena* и *Chlamydomonas*, обладающие жгутиками и способные ориентироваться относительно источника света. *В – Д*. Три вида диатомей. Диатомеи весьма многочисленны в морском планктоне. Их клетки одеты жестким панцирем, состоящим из двух половинок; этот панцирь имеет очень сложное строение, характерное для каждого вида диатомей. Состоит панцирь в основном из кремнезема (SiO_2). Микроскописты использовали когда-то пустые панцири (*Д*) диатомей для определения разрешающей способности линз. *Е* и *Ж*. Перидинеи тоже относятся к типичным фотосинтезирующим организмам морского планктона. Клетки обладают жгутиками и часто имеют очень причудливую форму, которую им придают их наружные целлюлозные оболочки. Среди них встречаются виды, ядовитые для рыб и человека. «Красные приливы» у побережья США вызываются массовым развитием красных перидиней, выделяющих сильный нервный яд.


Жгутик
Фоторецептор
Сократительная вакуоль
Клеточная мембрана
Ядро
Пиреноид
Хлоропласты
Euglena
А
Основание жгутика
Митохондрия
Ядро
Ядерная оболочка
Клеточная стенка
Клеточная мембрана
Хлоропласт
Крахмальное зерно
Пиреноид
Chlamydomonas
Б
В
50 мкм
Г
10 мм
Д
30 мкм
Е
200 мкм
Ж
100 мкм

Для восстановления двуокиси углерода они используют в качестве донора водорода воду и в ходе этого процесса выделяют молекулярный кислород, согласно уравнению

$$nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O)_n + nO_2, \qquad (1)$$

где n обычно считают равным 6, поскольку конечным продуктом восстановления CO_2 является глюкоза $[(CH_2O)_6{=}C_6H_{12}O_6]$.

Фотосинтезирующие бактерии кислорода не образуют, если не считать цианобактерий (их кислородпродуцирующая фотосинтетическая система сходна с той, которая имеется у зеленых растений). Более того, многие фотосинтезирующие бактерии являются облигатными анаэробами, т. е. вообще не переносят кислорода. В качестве доноров водорода некоторые фотосинтезирующие бактерии используют неорганические соединения. Зеленым серным бактериям, например, донором водорода служит сероводород согласно уравнению

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + H_2O + 2S.$$

Эти бактерии выделяют вместо молекулярного кислорода элементарную серу, представляющую собой продукт окисления H_2S. Другие фотосинтезирующие бактерии используют в качестве доноров водорода органические соединения, например лактат

$$2\text{Лактат} + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + H_2O + 2\text{Пируват}.$$

Корнелис ван Ниль, один из тех, кто первым занялся изучением метаболизма в сравнительном плане, пришел к убеждению, что у растений и бактерий процессы фотосинтеза в основе своей одинаковы, хотя в них используются разные доноры водорода. Сходство это становится явным, если написать уравнение фотосинтеза в более общей форме:

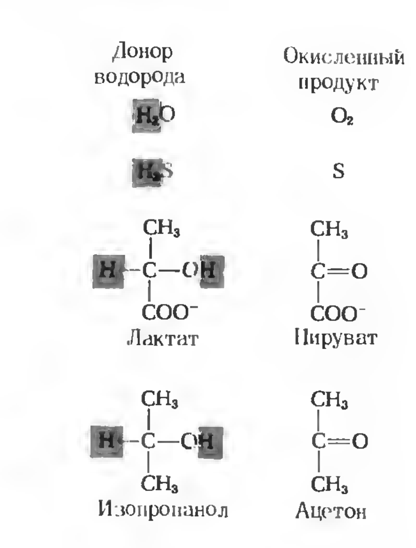


Рис. 23-3. Некоторые доноры водорода (доноры электронов), используемые различными фотосинтезирующими организмами. Передаваемые атомы водорода выделены красным. Донором электронов для зеленых растений служит H_2O; из нее они выделяют O_2.

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + H_2O + 2D,$$

где H_2D – донор водорода, а D – окисленная форма этого донора. Роль H_2D могут играть вода, сероводород, лактат или какие-нибудь другие органические соединения в зависимости от вида фотосинтезирующего организма (рис. 23-3). Ван Ниль высказал также предположение, что молекулярный кислород, образующийся в процессе фотосинтеза растений, происходит целиком из воды, а не из двуокиси углерода. Опыты с изотопной меткой, в которых изотопом ^{18}O метили либо воду, либо двуокись углерода, подтвердили это предположение (рис. 23-4). В этой главе мы рассмотрим в основном фотосинтез высших растений, при котором выделяется кислород.

$$H_2O + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} \text{Глюкоза} + O_2$$

Рис. 23-4. Источником O_2, выделяемого при фотосинтезе растений, служит H_2O.

23.4. Процесс фотосинтеза состоит из двух фаз – световой и темновой

Фотосинтез зеленых растений протекает в две стадии: первая из них объединяет *световые реакции*, идущие только тогда, когда растение освещено, а вторая – *темновые реакции*, которые могут происходить как в темноте, так и на свету. В световых реакциях энергия света поглощается хлорофиллом и другими пигментами фотосинтезирующих клеток и запасается в химической форме в виде двух высокоэнергетических продуктов – ATP и NADPH; одновременно выделяется кислород. В темновых реакциях ATP и NADPH, образовавшиеся в световых реакциях, используются для восстановления двуокиси углерода до глюкозы и других органических продуктов (рис. 23-5). Образование кислорода, происходящее только на свету, и восстановление двуокиси углерода, для которого свет не требуется, представляют собой, таким образом, два совершенно раздельных процесса.

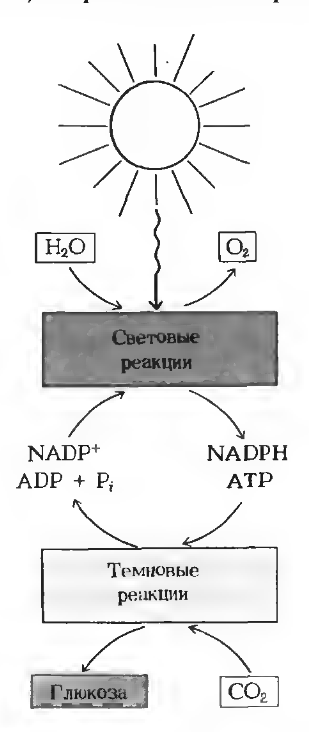


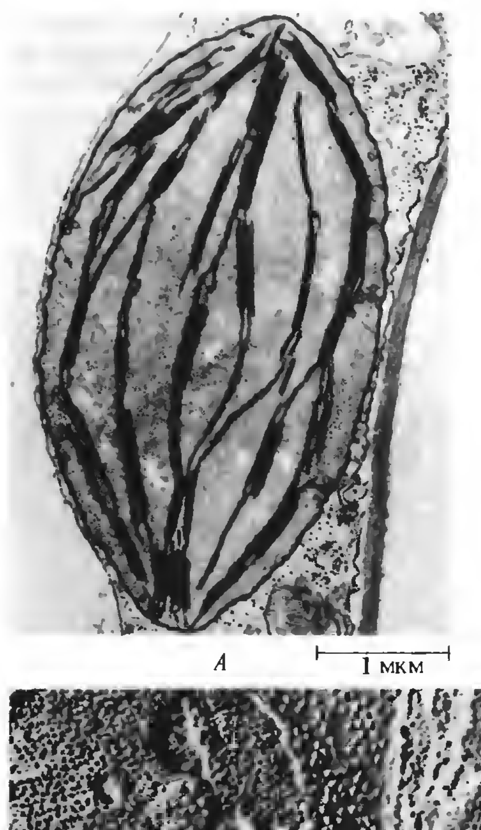
Рис. 23-5. В световых реакциях за счет солнечной энергии образуются высокоэнергетические соединения – NADPH и ATP. Эти соединения используются в темновых реакциях для восстановления CO_2, приводящего к образованию глюкозы.

Здесь следует, однако, отметить один важный момент, о котором мы подробнее поговорим позже. Хотя реакции, в которых происходит восстановление CO_2 до глюкозы, могут идти и в темноте, но регулируются они светом.

23.5. Фотосинтез растений протекает в хлоропластах

В эукариотических фотосинтезирующих клетках как световые, так и темновые реакции протекают в *хлоропластах*, которые можно рассматривать как главные «силовые станции» таких клеток. Следует, однако, напомнить, что в клетках зеленого листа содержатся также и митохондрии (разд. 2.8). Ночью, когда клетки не получают солнечной энергии, митохондрии генерируют необходимый им ATP, используя кислород для окисления углеводов, образовавшихся в хлоропластах в дневные часы.

Хлоропласты у разных растений имеют самую разнообразную форму, но, как правило, они гораздо крупнее митохондрий (рис. 23-6). Снаружи хлоропласты окружены непрерывной довольно хрупкой наружной мембраной. Внутренняя мембранная система ограничивает собой внутренний компартмент хлоропласта. В нем находится много плоских мембранных мешочков, или пузырьков, часто связанных с внутренней мембраной. Это так называемые *тилакоиды*; они обычно собраны в стопки, называемые *гранами* (рис. 23-6). В тилакоидных мембранах содержатся все фотосинтетические пигменты хлоропласта и все ферменты, необходимые для первичных световых реакций. Большинство ферментов, участвующих в темновых реакциях, в которых CO_2 восстанавливается до глюкозы, находится в жидкости, заполняющей внутренний компартмент хлоропласта и окружающей тилакоиды; ее называют *стромой*. У многих видов темновые реакции протекают также и



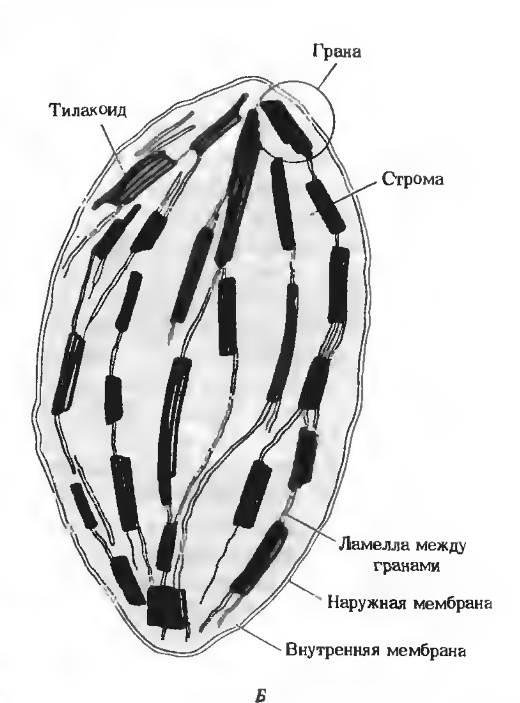




Рис. 23-6. *А*. Электронная микрофотография хлоропласта из листа шпината. *Б*. Схематическое изображение его структуры. *В*. Электронная микрофотография внутренней поверхности тилакоидной мембраны (препарат получен методом замораживания–скалывания). Частицы пирамидальной формы представляют собой, как полагают, молекулы ферментов, участвующих в фотосинтезе.

в цитозоле клетки. Хлоропласты легко могут быть выделены из экстрактов растертых листьев шпината дифференциальным центрифугированием (разд. 13.16).

23.6. Поглощение света переводит молекулы в возбужденное состояние

Видимый свет – это электромагнитное излучение с длиной волны от 400 до 700 нм. Излучение Солнца возникает в процессе слияния ядер водородных атомов с образованием атомов гелия и электронов. Этот процесс возможен благодаря чрезвычайно высоким температурам в недрах Солнца. В общем виде реакция может быть записана так:

$$4H \rightarrow {}^{4}He + 2e^{-} + h\nu,$$

где $h\nu$ – *квант* световой энергии, называемый также *фотоном*. Напомним, что свет имеет как волновые, так и корпускулярные свойства. Энергия, которой обладают фотоны, обратно пропорциональна длине световой волны (табл. 23-1). Наибольшей энергией обладают фотоны ко-

Таблица 23-1. Энергия фотонов

Длина волны, нм	Цвет	ккал/эйнштейн[1]
400	Фиолетовый	71,8
500	Голубой	57,7
600	Желтый	47,8
700	Красный	40,6

[1] Один эйнштейн (1 «моль» фотонов) содержит $6{,}023 \cdot 10^{23}$ фотонов.

ротковолновой (фиолетовой) области видимого спектра.

Способность химического соединения поглощать свет зависит от характера распределения электронов вокруг атомных ядер в его молекуле. При поглощении молекулой фотона один из ее электронов переходит на более высокий энергетический уровень. Происходит это по закону «все или ничего»: чтобы перевести электрон на более высокий энергетический уровень, фотон должен обладать определенным минимальным количеством энергии (лат. quantum – количество; отсюда второе название фотона – «квант»). Молекула, поглотившая фотон, находится в высокоэнергетическом *возбужденном состоянии*, которое, как правило, нестабильно. Если отключить источник света, то «высокоэнергетические» электроны обычно быстро вновь переходят на свои низкоэнергетические орбитали; при этом молекула возвращается в исходное стабильное, так называемое *основное состояние*, высвобождая энергию возбуждения (в форме света или тепла). Свет, испускаемый возбужденной молекулой при ее возвращении в основное состояние, называют *флуоресценцией* (рис. 23-7). Переход молекулы в возбужденное состояние под действием света и высвечивание энергии при флуоресценции – чрезвычайно быстрые процессы. Для возбуждения молекулы хлорофилла in vitro требуется всего лишь несколько пикосекунд (1 пс = 10^{-12} с). Время пребывания молекулы в возбужденном состоянии также чрезвычайно мало: вычислено, что за то время, пока молекула хлорофилла остается в возбужденном состоянии, реактивный самолет «Кон-



Рис. 23-7. Переход атома в возбужденное состояние в результате поглощения световой энергии. Когда атом возвращается в исходное основное состояние, он отдает поглощенную световую энергию (в форме флуоресценции или тепла). Однако в фотосинтезирующих клетках поглощенная энергия не высвобождается в форме флуоресценции, а запасается путем образования NADPH и ATP.

корд», летящий с максимальной скоростью, успевает пролететь всего 6 мкм.

Мы подошли теперь к очень важному вопросу. Если освещать раствор хлорофилла in vitro, то поглощенная энергия быстро вновь высвечивается в виде флуоресценции или рассеивается в виде тепла. Но если в возбужденное состояние переходит под действием видимого света хлорофилл в интактных листьях шпината, то флуоресценции не наблюдается. Вместо этого высокоэнергетические электроны покидают возбужденные молекулы хлорофилла и «перескакивают» на первый из переносчиков в цепи переноса электронов. Свет, таким образом, индуцирует поток электронов вдоль этой цепи. С этим потоком электронов сопряжены процессы, в результате которых образуются ATP и NADPH.

23.7. Хлорофиллы – это главные светопоглощающие пигменты

Обратимся теперь к рассмотрению светопоглощающих пигментов тилакоидных мембран. Первую роль среди них играют зеленые хлорофиллы – Mg^{2+}-комплексы молекул, напоминающие по

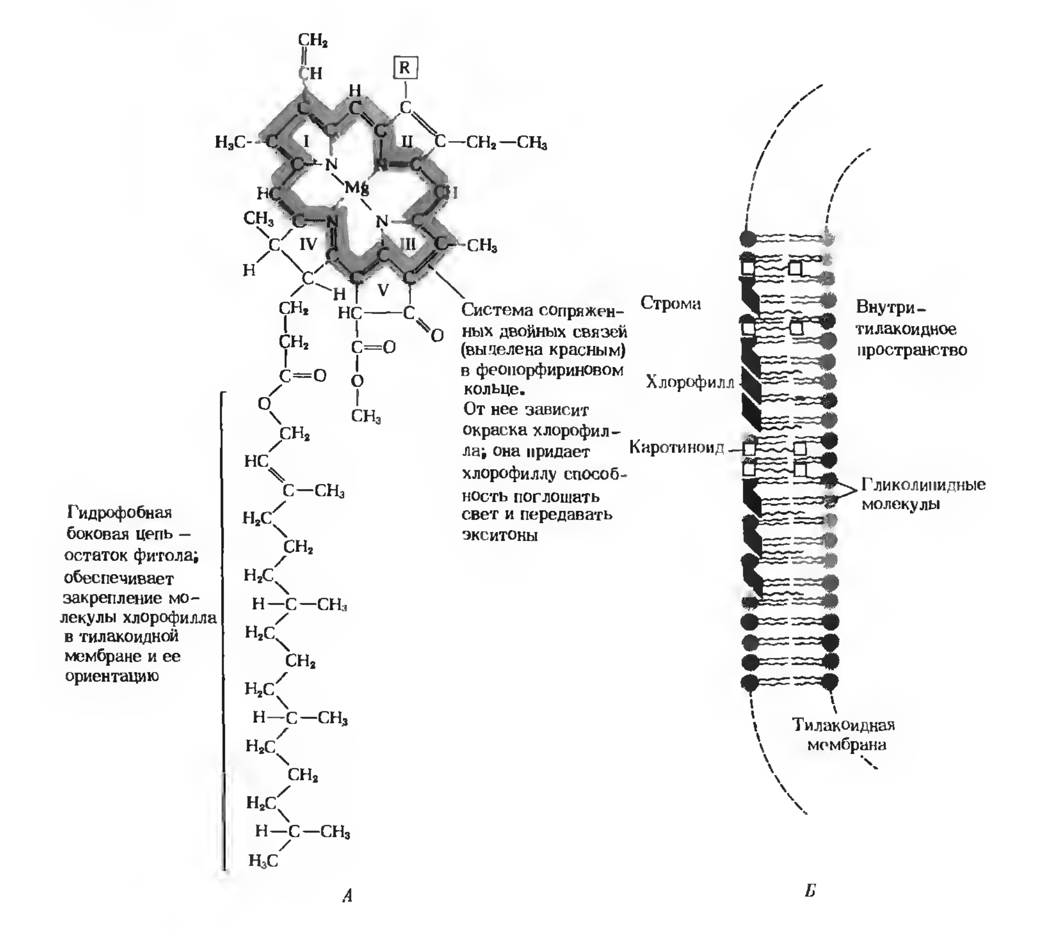


Рис. 23-8. *А*. Хлорофиллы *a* и *b*. В молекуле протопорфирина кольцо V отсутствует. R означает группу $—CH_3$ в хлорофилле *a* и группу —CHO в хлорофилле *b*. *Б*. Расположение светопоглощающих пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в тилакоидной мембране. Молекулы пигментов определенным образом ориентированы и объединены в так называемые фотосистемы. Молекулы хлорофилла связаны со специфическими белками в тилакоидной мембране. Для простоты эти белки здесь не показаны.

своей структуре протопорфирин гемоглобина (рис. 8-2). В молекуле хлорофилла *а*, присутствующего в хлоропластах всех клеток зеленых растений, содержатся четыре замещенных пиррольных кольца, из которых одно (кольцо IV) находится в восстановленной форме (рис. 23-8). Имеется еще и пятое, непиррольное, кольцо. Эту характерную структуру из пяти колец, представляющую собой производное порфирина, называют *феопорфирином* (от греч. pheo – бурый). Длинная изопреноидная боковая цепь в молекуле хлорофилла *а* представляет собой остаток спирта *фитола*, присоединенный сложноэфирной связью к карбоксильной группе заместителя в кольце IV (рис. 23-8). Четыре центральных атома азота в молекуле хлорофилла *а* координационно связаны с ионом Mg^{2+}.

В фотосинтезирующих клетках высших растений всегда присутствуют хлорофиллы двух типов. Один из них – это хлорофилл *а*, а второй представлен у многих видов *хлорофиллом b*, отличающимся от хлорофилла *а* тем, что вместо метильной группы при кольце II в нем содержится альдегидная группа (рис. 23-8). Хлорофиллы *а* и *b* могут быть выделены в чистом виде из экстрактов листьев хроматографическими методами. Хотя оба они окрашены в зеленый цвет, но их спектры поглощения слегка различаются. У большей части высших растений количество хлорофилла *а* примерно вдвое превышает количество хлорофилла *b*.

Рис. 23-8 позволяет понять, как структура хлорофилла *а* приспособлена к выполнению его биологической функции. Выделенная на рисунке красным цветом система из пяти колец, которая сама образует кольцо бóльших размеров вокруг атома Mg, придает молекуле способность поглощать свет. Атом Mg способствует образованию агрегатов молекул хлорофилла, что облегчает улавливание света. Длинная гидрофобная боковая цепь служит не только для закрепления молекул хлорофилла в липидном бислое мембран, но и для придания им определенной ориентации.

23.8. В тилакоидах содержатся также вспомогательные пигменты

В тилакоидных мембранах присутствуют вместе с хлорофиллами также и некоторые второстепенные светопоглощающие пегменты; их называют *вспомогательными*. К вспомогательным пигментам относятся различные *каротиноиды*, окрашенные в желтый, красный или пурпурный цвет. Среди них наиболее важны красный пигмент β-каротин (рис. 23-9) – изопреноидное соединение, которое служит у животных предшественником витамина А (разд. 10.14), и желтый каротиноид *ксантофилл*. Каро-

Рис. 23-9. β-Каротин, вспомогательный пигмент зеленых листьев. У различных видов растений вспомогательными пигментами служат многие другие каротиноиды. Обратите внимание, что молекула β-каротина, так же как и молекула хлорофилла, содержит много сопряженных двойных связей, которые придают ей способность поглощать свет и передавать экситоны.

тиноиды поглощают свет в ином диапазоне длин волн, нежели хлорофиллы; поэтому они функционируют как световые рецепторы, дополняющие хлорофиллы. Относительное содержание хлорофиллов и различных каротиноидов у разных видов растений заметно варьирует. Именно от соотношения этих пигментов зависит характерная окраска фотосинтезирующих клеток, изменяющаяся от сине-зеленой, как у хвоинок ели, или ярко-зеленой, как у листьев клена, до красной, бурой и даже пурпурной, как у разных видов многоклеточных водорослей и листьев некоторых декоративных растений.

23.9. В мембранах тилакоидов содержатся два типа фотохимических реакционных систем

Светопоглощающие пигменты тилакоидных мембран собраны в функциональные наборы, или ансамбли, как это показано на рис. 23-8, *Б*. В хлоропластах шпината эти ансамбли, называемые *фотосистемами*, содержат около 200 молекул хлорофиллов и около 50 молекул каротиноидов. Такие ансамбли способны поглощать свет в пределах всего видимого спектра, однако особенно интенсивно они поглощают в двух областях: от 400 до 500 и от 600 до 700 нм (рис. 23-10). Все пигментные молекулы данной фотосистемы поглощают фотоны, но только одна молекула в каждом ансамбле обладает способностью превращать световую энергию в химическую. Эта специализированная трансформирующая энергию пигментная молекула, представляющая собой молекулу хлорофилла, соединенную с особым белком, называется *фотохимическим реакционным центром.* Все прочие пигментные молекулы в такой фотосистеме, или ансамбле, называются *светособирающими* или *антенными молекулами.* Их функция заключается в поглощении световой энергии. Эту энергию они затем очень быстро передают отдельным реакционным центрам, в которых и происходит фотохимический акт (рис. 23-11).

В тилакоидных мембранах хлоропластов высших растений содержатся фотосистемы двух типов, каждая со своим набором светособирающих молекул хлорофиллов и каротиноидов и со своим фотохимическим реакционным центром. *Фотосистема I*, которая максимально активируется более длинноволновой частью спектра, характеризуется высоким отношением хлорофилла *a* к хлорофиллу *b*. Фотосистема II, максимально активируемая светом с длинами волн короче 680 нм, содержит относительно больше хлорофилла *b*, а иногда также хлорофилл *c*. В тилакоидных мембранах одного хлоропласта шпината имеется много сотен фотосистем того и другого типа. Позднее мы увидим, что эти две фотосистемы выполняют разные функции. Однако одно важное обобщение можно сформулировать уже сейчас. *Во всех фотосинтезирующих клетках, выделяющих*

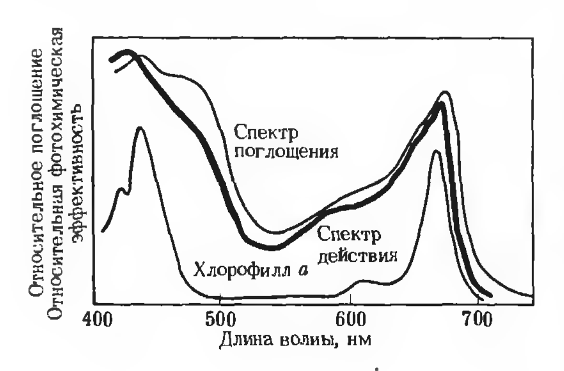


Рис. 23-10. Спектр поглощения и фотохимический спектр действия зеленого листа. Спектр поглощения характеризует долю энергии поглощенного света в зависимости от длины волны. Фотохимический спектр действия показывает зависимость относительной эффективности фотосинтеза от длины волны. Стимулировать фотосинтез может, вообще говоря, видимый свет любой длины волны, однако наибольшую эффективность фотосинтеза обеспечивают длины волн 400–500 и 600–700 нм. Для сравнения показан спектр поглощения чистого хлорофилла *a*, который в области 500–600 нм поглощает сравнительно слабо. В некоторых фотосинтезирующих клетках имеются вспомогательные пигменты, интенсивно поглощающие в этой области и, таким образом, дополняющие собой хлорофиллы.

кислород, т. е. в клетках высших растений и цианобактерий, содержатся обе фотосистемы, I и II; у фотосинтезирующих бактерий, не выделяющих кислорода, имеется только фотосистема I.

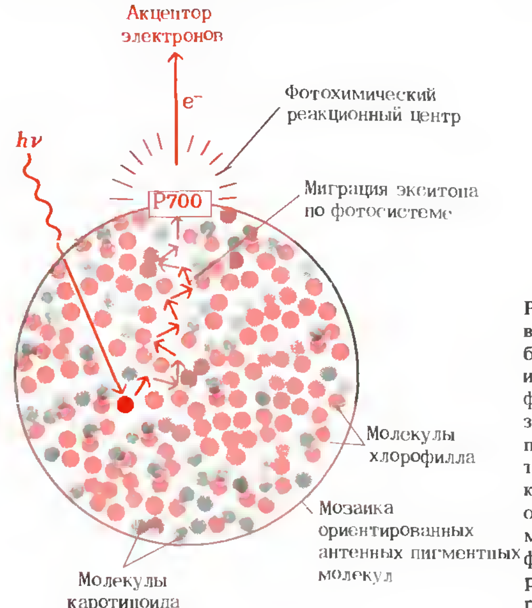


Рис. 23-11. Схематическое изображение поверхности фотосистемы в тилакоидной мембране. Она напоминает мозаику, составленную из нескольких сотен антенных молекул хлорофиллов и каротиноидов, определенным образом ориентированных в мембране. Экситон, поглощенный одной из антенных молекул, быстро мигрирует по пигментным молекулам к реакционному центру P700; путь экситона обозначен красными срелками. Все антенные молекулы способны поглощать свет, но трансформировать энергию экситона в поток электронов способна только молекула, играющая роль реакционного центра.

23.10. Свет индуцирует в хлоропластах поток электронов

Каким же образом поглощение света молекулами пигментов вызывает химическое изменение, приводящее в конце концов к превращению световой энергии в химическую?

Ключ к ответу на этот вопрос был получен в 1937 г. в Кембриджском университете Робертом Хиллом, внесшим большой вклад в изучение фотосинтеза. Он нашел, что если добавить к листовым экстрактам, содержащим хлоропласты, какой-нибудь небиологический акцептор водорода, а затем осветить эти препараты, то они будут выделять кислород и одновременно в них будет происходить восстановление акцептора водорода согласно уравнению

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{Свет}} 2AH_2 + O_2, \quad (2)$$

где A – искусственный акцептор водорода, а AH_2 – его восстановленная форма. Среди небиологических акцепторов водорода, которыми пользовался Хилл, был краситель 2,6-*дихлорфенолиндофенол*; его окисленная форма (A) окрашена в синий цвет, а восстановленная (AH_2) – бесцветна. При освещении экстрактов, в которых присутствовал этот краситель, раствор обесцвечивался и выделялся кислород; в темноте же не происходило ни выделения кислорода, ни восстановления красителя. Это наблюдение послужило отправной точкой для выяснения того, каким образом поглощенная световая энергия превращается в химическую: выяснилось, что световая энергия вызывает перенос электронов от H_2O на молекулу-акцептор. Хилл обнаружил также, что для этой реакции не требуется двуокиси углерода и что в этих условиях CO_2 не восстанавливается до какой-нибудь стабильной формы. Из этого Хилл заключил, что процессы выделения кислорода и восстановления двуокиси углерода могут быть разобщены. Реакцию, описываемую уравнением (2), называют *реакцией Хилла*, а искусственный акцептор электронов A – *реагентом Хилла*.

Далее начались поиски природного биологически активного аналога реаген-

та Хилла, т. е. того акцептора электронов, который присутствует в хлоропластах и присоединяет водородные атомы, отщепляемые на свету от воды. Спустя несколько лет выяснилось, что роль этого природного биологического акцептора электронов играет в хлоропластах $NADP^+$. Реакция описывается уравнением

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{\text{Свет}} 2NADPH + 2H^+ + O_2. \quad (3)$$

Отметим весьма существенную особенность этой реакции: электроны переходят здесь от воды к $NADP^+$, тогда как в дыхательной цепи митохондрий они движутся в обратном направлении, от NADH или NADPH к кислороду, с потерей свободной энергии (разд. 17.5). Поскольку индуцированный светом поток электронов в хлоропластах направлен «вверх», от H_2O к $NADP^+$, он невозможен без притока свободной энергии. Эту энергию поставляет поглощаемый хлоропластами свет.

23.11. Улавливаемая световая энергия создает поток электронов, направленный «вверх»

Каким образом световая энергия, улавливаемая хлоропластами, индуцирует поток электронов, направленный «вверх»?

Когда свет возбуждает молекулу хлорофилла, находящуюся в тилакоидной мембране, один из ее электронов переходит на более высокий энергетический уровень, определяемый энергией поглощенного света, в результате чего молекула и оказывается в возбужденном состоянии. Затем энергия возбуждения (экситон) быстро мигрирует по набору светособирающих пигментных молекул к реакционному центру фотосистемы, так что один из электронов этой фотосистемы приобретает большое количество энергии. Этот «горячий» электрон покидает реакционный центр и присоединяется к первому переносчику в цепи переноса электронов. Таким образом, первый переносчик в цепи оказывается восстановленным, поскольку он присоединил электрон, а реакционный центр – окисленным, поскольку он отдал свой электрон. Про реакционный центр в таком окисленном состоянии говорят, что в нем имеется *дырка*. Богатый энергией электрон, обладающий очень высоким восстановительным «давлением», переходит теперь по цепи переносчиков электронов к $NADP^+$ и восстанавливает его в NADPH (рис. 23-12). Ясно, что стандартный восстановительный потенциал этого фотохимического реакционного центра должен характеризоваться очень большой отрицательной величиной, для того чтобы электроны от реакционного центра могли двигаться «вниз» к $NADP^+$, потому что стандартный потенциал сопряженной окислительно-восстановительной пары $NADP^+$ – NADPH сам имеет достаточно большую отрицательную величину, равную −0,32 В (разд. 17.5).

Теперь возникают два вопроса. Каким образом вновь заполняется дырка, возникшая в реакционном центре? И как можно объяснить образование O_2 из воды? Для того чтобы ответить на эти вопросы, нам следует обратиться к рассмотрению общей схемы фотосинтетического потока электронов.

23.12. Перенос электронов от H_2O к $NADP^+$ происходит в результате взаимодействия фотосистем I и II

Набор светособирающих, или антенных, пигментов с его реакционным центром, поставляющим высокоэнергетические электроны для восстановления $NADP^+$, образует фотосистему I, максимально возбуждаемую светом с длиной волны 700 нм. Найдено, однако, что максимальная скорость выделения кислорода достигается лишь в том случае, если хлоропласты поглощают не только свет с длиной волны 700 нм, но и более корот-

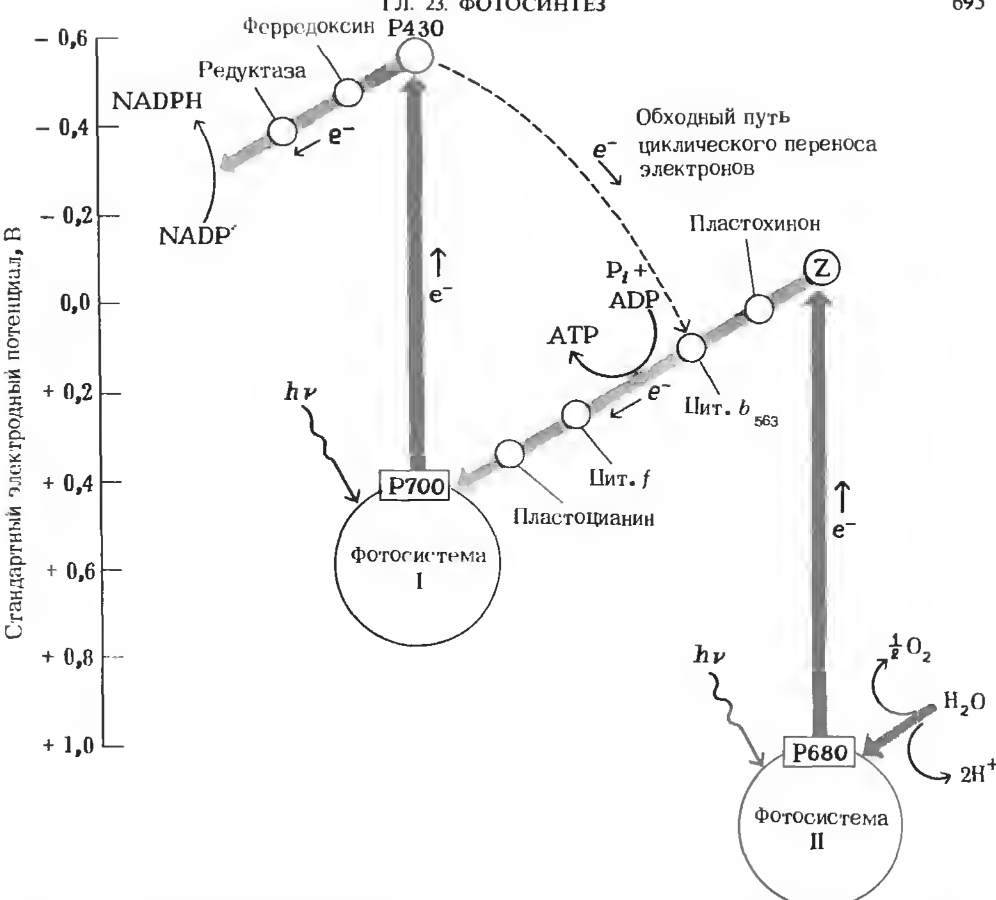


Рис. 23-12. Совместное действие фотосистем I и II. Эта зигзагообразная схема (Z-схема) показывает путь потока электронов от H_2O (*справа внизу*) к $NADP^+$ (*слева вверху*) в нециклическом фотосинтезе растений. Кроме того, она показывает энергетические взаимоотношения. Для того чтобы электроны, происходящие из молекул H_2O, оказались на энергетическом уровне, на котором они смогут восстановить $NADP^+$ в NADPH, каждый из них должен быть дважды «подброшен вверх» (жирные розовые стрелки) фотонами, поглощенными фотосистемой I и фотосистемой II. В каждой фотосистеме на один «подброшенный вверх» электрон расходуется один квант, или фотон. После каждого из таких «подбрасываний» электроны с избыточной энергией устремляются «вниз» (жирные серые стрелки) по указанным путям. С потоком электронов в цепи, соединяющей фотосистему II с фотосистемой I (см. разд. 23.14), сопряжено фотофосфорилирование ADP в ATP. Прерывистая черная стрелка между P430 и цитохромом *b* указывает альтернативный, или обходный, путь, которым следуют электроны в циклическом потоке электронов и фосфорилировании (см. текст и рис. 23-14). В циклическом потоке электронов участвует только фотосистема I; электроны возвращаются по обходному пути к фотосистеме I вместо того, чтобы восстанавливать $NADP^+$ в NADPH.

коволновый свет, например с длиной волны 600 нм. Если же освещать их одним только светом с длиной волны 700 нм (без освещения светом при 600 нм), то наблюдается резкое падение скорости выделения кислорода, называемое *красным падением*, потому что 700 нм – это конец красной области спектра. Из этих наблюдений был сделан вывод, что есть две фотосистемы, с максимумами поглощения при разных длинах волн, и что эти фотосистемы функционируют совместно в световых реакциях фотосинтеза растений, от которых зависит выделение кислорода. На рис. 23-12 приведена схема (ее часто называют Z-схемой от англ. zigzag – зигзаг), позволяющая проследить путь потока электронов между фотосистемами I и II, а также энергетические взаимоотношения этих двух фотосистем в световых реакциях.

Попробуем проследить сначала путь потока электронов. Движущей силой этого потока служит свет. Когда кванты све-

та поглощаются фотосистемой I, богатые энергией электроны выбрасываются из реакционного центра и по цепи переносчиков электронов передаются на $NADP^+$, восстанавливая его в NADPH. В результате такого процесса в фотосистеме I возникает дырка. Эта дырка заполняется затем электроном, выбрасываемым фотосистемой II при ее освещении; он попадает в фотосистему I по цепи переносчиков, связывающей фотосистему II с фотосистемой I. Это, однако, приводит к возникновению дырки в фотосистеме II. Она в свою очередь заполняется электроном, поступающим от H_2O. Расщепляясь, молекула воды дает: 1) электроны, заполняющие дырки в фотосистеме II, 2) H^+-ионы, поступающие в среду, и 3) молекулярный кислород, выделяемый в газовую фазу. Уравнение для расщепления воды имеет вид

$$2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2.$$

Z-схема, таким образом, описывает весь путь, по которому электроны переходят от H_2O к $NADP^+$ согласно уравнению

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{\text{Свет}} O_2 + 2NADPH + 2H^+.$$

На каждый электрон, переходящий от H_2O к $NADP^+$, поглощаются два кванта света, по одному на каждую фотосистему. Для образования одной молекулы O_2 от H_2O к $NADP^+$ должны быть переданы четыре электрона, т. е. должно быть поглощено восемь квантов – по четыре на каждую фотосистему.

23.13. Z-схема представляет фотосинтетический перенос электронов в виде энергетической диаграммы

На рис. 23-12 представлен не только путь электронов, переходящих от H_2O к $NADP^+$, но и энергетические взаимоотношения. Вертикальная ось этой диаграммы соответствует энергетической шкале. Процессы, при которых электроны переносятся «вверх» (красные стрелки), требуют затраты световой энергии, а процессы, при которых электроны движутся «вниз» (черные стрелки), сопровождаются уменьшением свободной энергии. При поглощении кванта света фотосистемой I один из ее электронов переходит из состояния с относительно низкой энергией в состояние, богатое энергией, вследствие чего фотохимический реакционный центр фотосистемы I, находящийся теперь в возбужденном состоянии, становится очень мощным восстановителем, так что электроны движутся от него «вниз» к $NADP^+$ и восстанавливают его в NADPH. Высокоэнергетические электроны, движущиеся от фотосистемы II к фотосистеме I, также получили энергию от квантов света, но от тех, которые были поглощены фотосистемой II. Дырки в фотосистеме II, ставшей теперь очень мощным окислителем (акцептором электронов), заполняются электронами, которые движутся «вниз» от H_2O. Z-схема, следовательно, показывает тот путь, по которому электроны переходят от H_2O к $NADP^+$, восстанавливая его в NADPH, т. е. путь от большого положительного стандартного потенциала (+0,82 В) к большому отрицательному (−0,32 В). Свободную энергию, необходимую для переноса одного электрона от H_2O к $NADP^+$, поставляют два поглощенных кванта света; один из них поглощается фотосистемой I, а другой – фотосистемой II.

23.14. В фотосинтетическом переносе электронов принимает участие ряд переносчиков

Когда реакционный центр фотосистемы I, представляющий собой комплекс молекулы хлорофилла *a* с особым белком, переходит в возбужденное состояние под действием квантов света, полученных от антенных молекул, поглощение хлоропластов в области 700 нм снижается. По этой причине реакционный центр фотосистемы I принято обозначать через *P700* (рис. 23-12). Первым переносчиком в цепи переноса электронов, ведущей от P700 к $NADP^+$, является, как полагают, какой-то *железо-серный белок*, обозначаемый как *P430*. Вторым переносчиком электронов служит другой железо-серный белок – *ферре-*

Пластохинон А

Пластохинол А

Рис. 23-13. Пластохинон А – самый распространенный пластохинон у высших растений и водорослей. Другие пластохиноны отличаются от него длиной боковой цепи и природой заместителей в хиноновом кольце. Пластохинол представляет собой восстановленную форму пластохинона.

доксин. Ферредоксин из листьев шпината, который удалось получить в кристаллическом виде, имеет молекулярную массу около 10 700; его молекула содержит два атома железа, связанные с двумя атомами кислотолабильной серы. Атомы железа, присутствующие в P430 и ферредоксине, осуществляют одноэлектронный перенос, сопряженный с обратимым изменением валентности Fe(II)–Fe(III).

Роль третьего переносчика электронов играет флавопротеин, называемый *ферредоксин-NADP—оксидоредуктазой.* Он переносит электроны от восстановленного ферредоксина (Fd_{red}) к $NADP^+$, восстанавливая последний в NADPH

$$2Fd^{2+}_{red} + 2H^+ + NADP^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow 2Fe^{3+}_{ox} + NADPH + H^+.$$

Кроме того, имеется еще цепь переносчиков электронов, по которой электроны движутся «вниз» от возбужденного реакционного центра фотосистемы II к дыркам фотосистемы I (рис. 23-12). В окисленном состоянии реакционный центр фотосистемы II характеризуется максимумом поглощения при 680 нм (отсюда его обозначение P680). О природе его мы почти ничего не знаем; считается, что он сходен с реакционным центром P700 фотосистемы I, т.е. тоже представляет собой комплекс хлорофилла с белком. Мало что известно и о природе первого переносчика электронов в этой цепи; обычно его обозначают как Z. От восстановленной формы Z электроны передаются «вниз» к *пластохинону*, или PQ (рис. 23-13),– жирорастворимому хинону с длинной изопреноидной боковой цепью, напоминающему убихинон дыхательной цепи митохондрий. Восстановленная форма пластохинона в свою очередь передает электроны цитохрому типа *b*, называемому *цитохромом* b_{563}. От него они переходят на цитохром *f* (от лат. frons – листья), который близок к *цитохрому c* митохондрий. Цитохром *f* передает электроны медьсодержащему голубому белку – *пластоцианину.* Истинным переносчиком электронов является атом меди этого белка, способный к обратимому изменению валентности Cu(I)–Cu(II). Пластоцианин служит непосредственным донором электронов для дырок в реакционном центре P700 фотосистемы I.

Дырки в реакционном центре P680 фотосистемы II заполняются электронами, отщепляемыми от воды Mn^{2+}-содержащим ферментным комплексом, который называется H_2O-дегидрогеназой; он пока еще плохо изучен.

Здесь следует непременно отметить одно очень важное обстоятельство. Всю последовательность реакций, изображенных на рис. 23-12, мы объединяем под общим названием «световые реакции» фотосинтеза. Такое определение удобно, поскольку оно вполне четко разграничивает энергогенерирующую фазу фотосинтеза и темновые реакции, обеспечивающие восстановление CO_2 до глюкозы. Однако название «световые реакции» не вполне точно. В действительности только для двух этапов этих «световых реакций» нужен свет, а именно для тех этапов, которые переводят в возбужденное состояние два фотохимических реакционных центра (рис. 23-12). После того как электроны, поглотив световую энергию, перейдут на более высокий энергетический уровень, все остальные этапы фотосинтетического переноса электронов могут уже идти и в темноте.

Поэтому пользоваться термином «световые реакции» следует всегда с полным пониманием природы того процесса, о котором идет речь.

23.15. Фосфорилирование ADP сопряжено с фотосинтетическим переносом электронов

Итак, мы теперь знаем, как в результате фотосинтетического переноса электронов от H_2O к $NADP^+$ образуется один из двух высокоэнергетических продуктов световых реакций, а именно NADPH. Что же известно о втором высокоэнергетическом продукте, т. е. об ATP?

В 1954 г. Даниэль Арнон со своими сотрудниками в Калифорнийском университете в Беркли обнаружил, что при фотосинтетическом переносе электронов в освещаемых хлоропластах шпината из ADP и фосфата синтезируется ATP. Одновременно и независимо от них Альберт Френкель в Университете штата Миннесота наблюдал синтез ATP в освещаемых *хроматофорах* (мембранных пигментсодержащих структурах), выделенных из фотосинтезирующих бактерий. Обе группы исследователей пришли к выводу, что какая-то часть световой энергии, улавливаемой фотосинтетическими системами этих организмов, трансформируется в энергию фосфатной связи ATP. Этот процесс стали называть *фотосинтетическим фосфорилированием* или *фотофосфорилированием* в отличие от окислительного фосфорилирования, протекающего в дышащих митохондриях.

Напомним (разд. 17.13), что фосфорилирование ADP до ATP в митохондриях происходит за счет свободной энергии, высвобождающейся, когда богатые энергией электроны движутся по цепи переноса электронов «вниз» от субстрата к кислороду. Точно так же сопряжено с переносом электронов и фотофосфорилирование ADP до ATP; в этом случае энергия высвобождается, когда богатые энергией электроны движутся по фотосинтетической цепи переноса электронов «вниз» от возбужденной фотосистемы II к дыркам фотосистемы I. Большинство данных указывает, что на каждую пару электронов, переносимых по цепи, соединяющей фотосистемы II и I, образуется одна молекула ATP. Некоторые авторы, однако, считают, что на каждую пару электронов образуются не одна, а две молекулы ATP.

23.16. В хлоропластах возможен также циклический поток электронов и циклическое фотофосфорилирование

Существует еще один тип потока электронов, индуцируемого светом в хлоропластах; его называют *циклическим* в отличие от *нециклического*, направленного от H_2O к $NADP^+$. В циклический поток электронов вовлекается только фотосистема I (рис. 23-12 и 23-14). Циклическим этот поток называется потому, что электроны, выброшенные фотосистемой I при ее освещении и присоединенные первым акцептором электронов, P430, не переходят затем к $NADP^+$, а возвращаются обходным путем в фотосистему I и заполняют в ней дырку. Этот обходной путь, или шунт, включает несколько переносчиков электронов из числа тех, которые входят в цепь, соединяющую фотосистемы II и I, а также участок, соответствующий этапу фосфорилирования. Таким образом, при освещении фотосистемы I электроны могут совершать циклические переходы–покидать реакционный центр фотосистемы I и вновь возвращаться в него. Энергия, необходимая для проведения одного электрона через такой цикл, обеспечивается поглощением одного кванта света. Циклический поток электронов не сопровождается реальным образованием NADPH и выделением кислорода, однако ему сопутствует фосфорилирование ADP до ATP–так называемое *циклическое фотофосфорилирование* (рис. 23-14). Суммарное уравнение для циклического потока электронов и фотофосфорилирования имеет простой вид

$$P_i + ADP + \text{Световая энергия} \rightarrow$$
$$\rightarrow ATP + H_2O$$

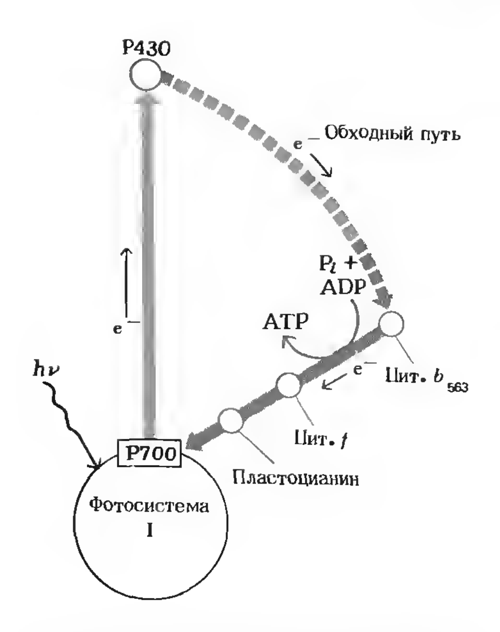


Рис. 23-14. Путь электронов при циклическом фотофосфорилировании. Участвует только фотосистема I. Поглощенная световая энергия используется только для синтеза АТР. Ср. с рис. 23-12.

Предполагается, что циклический поток электронов и фотофосфорилирование включаются в растительной клетке тогда, когда она вполне обеспечена восстановительной силой в форме NADPH, но при этом испытывает потребность в дополнительном количестве АТР для других метаболических нужд. Однако относительно регуляции этого циклического пути мало что известно.

23.17. Фотосинтетическое фосфорилирование сходно с окислительным фосфорилированием

Фотосинтетический перенос электронов и фотофосфорилирование в хлоропластах во многом сходны с переносом электронов и окислительным фосфорилированием в митохондриях. Это сходство проявляется в следующем: 1) реакционные центры, переносчики электронов и ферменты, участвующие в образовании АТР, находятся в мембране тилакоидов; 2) необходимым условием фотофосфорилирования является целостность тилакоидных мембран; 3) тилакоидная мембрана непроницаема для ионов H^+; 4) фотофосфорилирование можно разобщить с переносом электронов при помощи реагентов, способных стимулировать прохождение ионов H^+ через тилакоидную мембрану; 5) фотофосфорилирование можно блокировать *олигомицином* и другими аналогичными агентами, подавляющими в митохондриях синтез АТР из ADP и фосфата, катализируемый АТР-синтетазой (разд. 17.14); 6) синтез АТР осуществляется «грибовидными» ферментными молекулами, находящимися на наружной поверхности тилакоидной мембраны; по своей структуре и функции они очень напоминают F_1-АТРазу митохондрий, вследствие чего их часто обозначают символом CF_1 (от англ. chloroplast – хлоропласт).

Подобно внутренней митохондриальной мембране (рис. 17-2), тилакоидная мембрана асимметрична по своему молекулярному строению (рис. 23-15). Молекулы переносчиков в цепи переноса электронов, ведущей от фотосистемы II к фотосистеме I, ориентированы в тилакоидной мембране таким образом, что перенос электронов создает реаль-

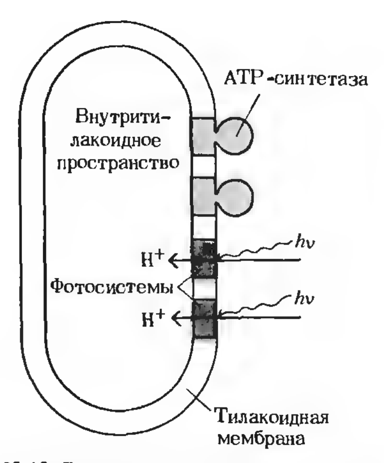


Рис. 23-15. Внутренняя и наружная поверхности тилакоидной мембраны различны. Фотосистемы и цепь переноса электронов ориентированы таким образом, что они накачивают ионы H^+ внутрь тилакоида. АТР-синтетазные «головки» (CF_1) располагаются на наружной поверхности мембраны.

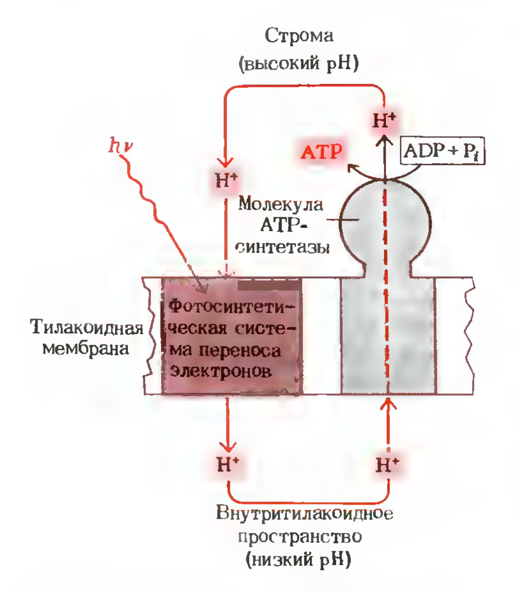


Рис. 23-16. Фотосинтетический H^+-цикл. Фотосинтетический перенос электронов вызывает перекачивание ионов H^+ из наружной среды в тилакоид, в результате чего возникает трансмембранный H^+-градиент, обращенный кислым концом внутрь. Возврат ионов H^+ наружу через ориентированную ATP-синтетазную молекулу поставляет энергию для синтеза ATP из ADP и фосфата.

ный поток ионов H^+ через тилакоидную мембрану, направленный снаружи внутрь. Под влиянием индуцированного светом потока электронов возникает, следовательно, трансмембранный градиент концентрации ионов H^+, так что с внутренней стороны тилакоидных пузырьков среда становится более кислой, чем с наружной. Все эти свойства согласуются с хемиосмотической гипотезой, предложенной первоначально для объяснения окислительного фосфорилирования, а позднее распространенной и на фотосинтетическое фосфорилирование. Схема на рис. 23-16 изображает поток ионов H^+, движимых световой энергией; ионы H^+ поступают из стромы внутрь тилакоида и вновь возвращаются наружу через молекулы ATP-синтетазы.

В 1966 г. Андрэ Ягендорф поставил важный эксперимент, доказавший, что источником энергии для синтеза ATP действительно может служить трансмембранный градиент pH, обращенный щелочным концом наружу. Сначала он инкубировал хлоропласты в темноте в буферном растворе (pH 4), который медленно проникал во внутренний компартмент тилакоидов, снижая pH их содержимого. Затем, после добавления к этой темновой суспензии хлоропластов ADP и фосфата, он быстро доводил pH среды до 8, добавляя к ней щелочной буфер, т. е. мгновенно создавал большой трансмембранный градиент pH. Когда этот градиент начинал уменьшаться вследствие выхода ионов H^+ из тилакоидов в среду, происходило образование ATP из ADP и фосфата. Поскольку ATP синтезировался в темноте, этот эксперимент доказывал, что трансмембранный градиент pH есть высокоэнергетическое состояние, посредством которого энергия переноса электронов передается ATP-синтетазе, получающей таким образом возможность генерировать ATP, как это постулируется хемиосмотической гипотезой.

23.18. Общее уравнение фотосинтеза растений

Изменение стандартной свободной энергии в процессе синтеза глюкозы из CO_2 и H_2O

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

равно +686 ккал/моль (вспомним, что окисление глюкозы, представляющее собой обращение этого процесса, сопровождается *уменьшением* стандартной свободной энергии на 686 ккал/моль). Сравним теперь эту потребность в энергии с количеством энергии, поставляемым световыми реакциями фотосинтеза растений. Как мы уже знаем, для переноса одного электрона от H_2O к $NADP^+$ должно быть поглощено два кванта света, по одному на каждую фотосистему. Образование одной молекулы O_2 сопряжено с переносом четырех электронов, т. е. требует поглощения восьми квантов. Для выделения шести молекул O_2 в соответствии с приведенным выше уравнением должно быть поглощено и использовано $6 \cdot 8 = 48$ квантов. Поскольку энергия одного «моля» квантов колеблется от 72 ккал при 400 нм до пример-

но 41 ккал при 700 нм (табл. 23-1), зеленым клеткам в стандартных условиях для образования одного моля глюкозы, который «стоит» 686 ккал, требуется от $48 \cdot 41 = 1968$ до $48 \cdot 72 = 3456$ ккал – в зависимости от длины волны поглощаемого света.

23.19. Фотосинтетическое образование гексоз связано с реальным восстановлением двуокиси углерода

Познакомимся теперь с тем, каким образом фотосинтезирующие организмы образуют глюкозу и прочие углеводы из CO_2 и H_2O, используя для этой цели энергию ATP и NADPH, образующихся в результате фотосинтетического переноса электронов. Здесь мы сталкиваемся с существенным различием между фотосинтезирующими организмами и гетеротрофами. Зеленым растениям и фотосинтезирующим бактериям двуокись углерода может служить единственным источником всех углеродных атомов, какие требуются им не только для биосинтеза целлюлозы или крахмала, но и для образования липидов, белков и многих других органических компонентов клетки. В отличие от них животные и вообще все гетеротрофные организмы не способны осуществлять реальное восстановление CO_2 и образовывать таким образом «новую» глюкозу в сколько-нибудь заметных количествах. Мы, правда, видели, что CO_2 может поглощаться животными тканями, например в ацетил-СоА-карбоксилазной реакции во время синтеза жирных кислот

$$\text{Ацетил-CoA} + CO_2 + ATP + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Малонил-CoA} + ADP + P_i,$$

но эта CO_2, включившаяся в малонил-СоА, утрачивается на одном из последующих этапов (разд. 21.7). Сходным образом теряет организм и ту CO_2, которая поглощается животными тканями при участии пируваткарбоксилазы в процессе глюконеогенеза (разд. 20.2) или при участии карбамоилфосфат-синтетазы I в процессе образования мочевины (разд. 19.17). Ясно, что у растений и других фотосинтезирующих организмов должен существовать какой-то определенный метаболический путь для использования CO_2 в качестве единственного источника углерода при синтезе глюкозы. Сам по себе этот путь не требует света – составляющие его реакции протекают в темновой фазе фотосинтеза.

23.20. Двуокись углерода фиксируется в форме фосфоглицерата

Важным ключом к пониманию механизма фиксации CO_2 у фотосинтезирующих организмов послужили работы Мелвила Кальвина и его сотрудников в Калифорнийском университете в Беркли, выполненные в конце 40-х годов. Исследователи освещали суспензию зеленых водорослей в течение всего нескольких секунд в присутствии радиоактивной двуокиси углерода ($^{14}CO_2$), а затем быстро убивали клетки, экстрагировали их и хроматографическими методами определяли, в каких метаболитах радиоактивный углерод появлялся раньше всего. Первым соединением, включившим метку, оказался *3-фосфоглицерат*, один из промежуточных продуктов гликолиза (разд. 15.7б). Расщепление этого соединения показало, что радиоактивный углерод сосредоточен главным образом в карбоксильной группе. Это было очень важным открытием, потому что в животных тканях в присутствии радиоактивной CO_2 не наблюдается быстрого включения метки в углерод карбоксильной группы. Полученные результаты, следовательно, давали все основания считать, что 3-фосфоглицерат является одним из первых промежуточных продуктов фотосинтеза. В пользу этого говорил и тот факт, что 3-фосфоглицерат быстро превращается в глюкозу в растительных экстрактах.

Дальнейшие исследования позволили выявить в экстрактах из зеленых листьев фермент, ответственный за переход $^{14}CO_2$ в органическую форму. Им ока-

залась *рибулозодифосфат-карбоксилаза*, катализирующая ковалентное включение CO_2 и одновременное расщепление пятиуглеродного сахара *рибулозо-1,5-дифосфата* с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата, из которых одна несет в своей карбоксильной группе радиоактивный углерод, включенный в виде CO_2 (рис. 23-17). Этот фермент, не встречающийся в животных тканях, имеет очень сложное строение (рис. 23-18) и молекулярную массу 550 000; локализуется он на наружной поверхности тилакоидной мембраны. На долю его приходится около 15% всего белка хлоропластов. Рибулозодифосфат-карбоксилаза — самый распространенный фермент в биосфере. Это главный фермент, ответственный за образование биомассы из CO_2 в растительном мире.

3-фосфоглицерат, образовавшийся под действием рибулозодифосфат-карбоксилазы, может затем превращаться в глюкозо-6-фосфат путем обращения гликолитических реакций с использованием

$^1CH_2-O-PO_3^{2-}$
C=O
H—C—OH
H—C—OH
$^2CH_2-O-PO_3^{2-}$
Рибулозо-1,5-дифосфат

CO_2, H_2O — Рибулозодифосфат-карбоксилаза

$CH_2-O-PO_3^{2-}$
H—C—OH
COO^-
3-фосфоглицерат
+
COO^-
H—C—OH
$CH_2-O-PO_3^{2-}$
3-фосфоглицерат

Рис. 23-17. Фиксация двуокиси углерода в реакции, катализируемой рибулозодифосфат-карбоксилазой. Фиксированная CO_2 обнаруживается в виде карбоксильной группы одной из двух молекул 3-фосфоглицерата, образующихся в этой реакции.

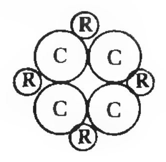


Рис. 23-18. Субъединичная структура рибулозодифосфат-карбоксилазы (*вид сверху*). Непосредственно под набором из восьми субъединиц, который здесь представлен, лежит второй набор точно таких же субъединиц. Таким образом, молекула фермента состоит из восьми больших, или каталитических, субъединиц (C) и восьми малых, или регуляторных, (R).

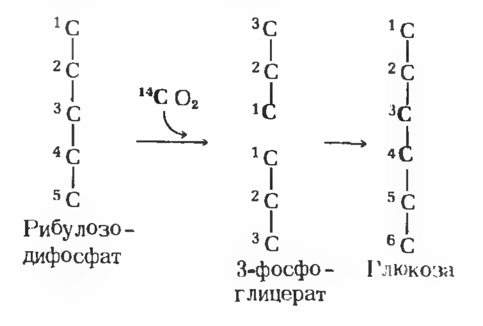


Рис. 23-19. Ферменты не способны отличить друг от друга две молекулы 3-фосфоглицерата, образовавшиеся из рибулозо-1,5-дифосфата. Поэтому в опытах с меченой двуокисью углерода ($^{14}CO_2$) метка, включающаяся в конечном счете в глюкозу, обнаруживается в ней как в положении 3, так и в положении 4.

«обходной» фруктозодифосфатазной реакции (разд. 20.3), точно так же, как это происходит в животных тканях. Схема на рис. 23-19 содержит указание на эту последовательность реакций.

23.21. Глюкоза образуется из CO_2 в цикле Кальвина

Реакции, о которых дают представление рис. 23-17 и 23-19, могут объяснить нам реальное превращение CO_2 лишь в один из шести углеродных атомов глюкозы. Каким же образом получаются из CO_2 еще пять углеродных атомов глюкозы? В поисках ответа на этот вопрос Кальвин с сотрудниками постулировали существование сложного циклического механизма, обеспечивающего полный биосинтез глюкозы, т. е. образование всех ее шести углеродных атомов

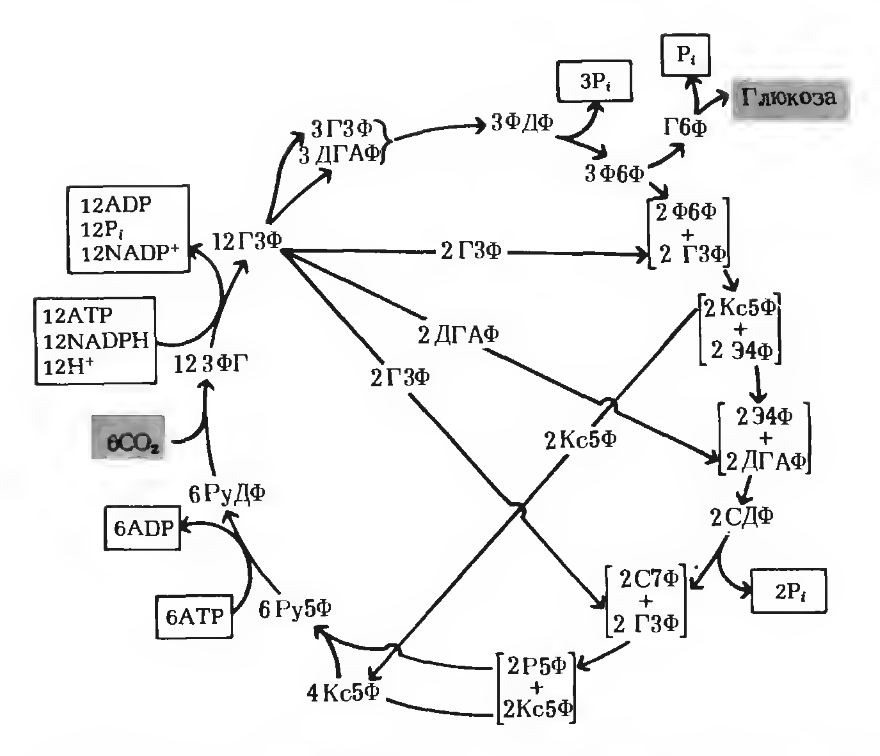


Рис. 23-20. Цикл Кальвина - превращение CO_2 в D-глюкозу в процессе фотосинтеза. Вступающая в цикл CO_2 и конечный продукт, глюкоза, показаны на красном фоне. Все прочие соединения, вступающие в цикл или выходящие из него, обведены рамкой. Сбалансированные уравнения реакций см. на рис. 23-21. 3ФГ – 3-фосфоглицерат; Г3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат; ФДФ – фруктозо-1,6-дифосфат; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат; Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Э4Ф – эритрозо-4-фосфат; Кс5Ф - ксилулозо-5-фосфат; СДФ – седогептулозо-1,7-дифосфат; С7Ф – седогептулозо-7-фосфат; Р5Ф – рибозо-5-фосфат; Ру5Ф – рибулозо-5-фосфат; РуДФ – рибулозо-1,5-дифосфат.

из двуокиси углерода (рис. 23-20). В цикле Кальвина на каждую фиксированную молекулу CO_2 потребляется одна молекула рибулозо-1,5-дифосфата, которая, однако, регенерирует в конце цикла. Здесь, следовательно, перед нами тот же химический «трюк», что и в цикле лимонной кислоты или в цикле мочевины: оба они, как мы помним, завершаются регенерацией соединения, использованного на первом этапе цикла, т. е. оксалоацетата в цикле лимонной кислоты (разд. 16.3) и орнитина в цикле мочевины (разд. 19.17). На рис. 23-21 приведены в виде сбалансированных уравнений отдельные реакции, из которых слагается цикл Кальвина. Семь этапов в этом цикле [реакции (2)–(8)] совпадают с этапами глюконеогенеза в животных тканях (гл. 20). Единственное различие заключается в том, что в процессе фотосинтеза восстановителем при образовании глицеральдегид-3-фосфата служит не NADH, а NADPH. Остальные реакции (рис. 23-21) катализируются шестью дополнительными ферментами. Для лучшего понимания этого сложного процесса общее уравнение цикла Кальвина удобно записать в следующем виде:

$$6\text{Рибулозо-1,5-дифосфат} + 6CO_2 + 18ATP + 12H_2O + 12NADPH + 12H^+ \rightarrow 6\text{Рибулозо-1,5-дифосфат} + \text{Глюкоза} + 18P_i + 18ADP + 12NADP^+.$$

Рибулозо-1,5-дифосфат вписан здесь в обе части уравнения, чтобы показать, что это необходимый компонент, реге-

$6CO_2$ + 6Рибулозо-1,5-дифосфат + $6H_2O$ → 12 3-фосфоглицерат (1)
12 3-фосфоглицерат + 12ATP → 12 3-фосфоглицероилфосфат + + 12ADP (2)
12 3-фосфоглицероилфосфат + 12NADPH + $12H^+$ → → 12Глицеральдегид-3-фосфат + $12NADP^+$ + $12P_i$ (3)
5Глицеральдегид-3-фосфат → 5Дигидроксиацетонфосфат (4)
3Глицеральдегид-3-фосфат + 3Дигидроксиацетонфосфат → → 3Фруктозо-1,6-дифосфат (5)
3Фруктозо-1,6-дифосфат + $3H_2O$ → 3Фруктозо-6-фосфат + $3P_i$ (6)
Фруктозо-6-фосфат → Глюкозо-6-фосфат (7)
Глюкозо-6-фосфат + H_2O → Глюкоза + P_i (8)
2Фруктозо-6-фосфат + 2Глицеральдегид-3-фосфат $\xrightarrow{\text{Транскетолаза}}$ → 2Ксилулозо-5-фосфат + 2Эритрозо-4-фосфат (9)
2Эритрозо-4-фосфат + 2Дигидроксиацетонфосфат $\xrightarrow{\text{Альдолаза}}$ → 2Седогептулозо-1,7-дифосфат (10)
2Седогептулозо-1,7-дифосфат + $2H_2O$ $\xrightarrow{\text{Фосфатаза}}$ → 2Седогептулозо-7-фосфат + $2P_i$ (11)
2Седогептулозо-7-фосфат + 2Глицеральдегид-3-фосфат $\xrightarrow{\text{Транскетолаза}}$ → 2Рибозо-5-фосфат + 2Ксилулозо-5-фосфат (12)
2Рибозо-5-фосфат $\xrightarrow{\text{Изомераза}}$ 2Рибулозо-5-фосфат (13)
4Ксилулозо-5-фосфат $\xrightarrow{\text{Эпимераза}}$ 4Рибулозо-5-фосфат (14)
6Рибулозо-5-фосфат + 6ATP $\xrightarrow{\text{Фосфорибулокиназа}}$ 6Рибулозо-1,5-дифосфат + 6ADP (15)

Суммарная реакция:

$6CO_2 + 18ATP + 12H_2O + 12NADPH + 12H^+ \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18P_i + 18ADP + 12NADP^+$

Рис. 23-21. Сбалансированные уравнения реакций для превращения CO_2 в глюкозу (рамка) в цикле Кальвина. В реакциях с (1) по (8) образуется глюкоза, а в реакциях с (9) по (15) регенерирует рибулозо-1,5-дифосфат.

нерирующий в конце каждого цикла. Убрав его в обеих частях уравнения, мы получим суммарное уравнение цикла Кальвина

$$6CO_2 + 18ATP + 12H_2O + 12NADPH + 12H^+ \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18P_i + 18ADP + 12NADP^+.$$

На синтез каждой молекулы глюкозы из шести молекул CO_2 расходуются 18 молекул ATP и 12 молекул NADPH, восполняемые затем за счет световых реакций фотосинтеза.

Рассмотрим теперь последовательные реакции цикла Кальвина (рис. 23-21). Реакции (1)–(8) приводят к образованию глюкозы из CO_2 и рибулозо-1,5-дифосфата. Реакции (9)–(15) связаны с регенерацией рибулозо-1,5-дифосфата, которая необходима для того, чтобы мог начаться новый оборот цикла Кальвина. Реакция (9) катализируется *транскетолазой*, Mg^{2+}-зависимым ферментом, у которого простетической группой является тиаминпирофосфат. Транскетолаза катализирует обратимый перенос кетоловой ($CH_2OH—CO—$) группы от кетозофосфата, в данном случае от фруктозо-6-фосфата, на альдозофосфат, в данном случае на глицеральдегид-3-фосфат (рис. 23-22). В реакции (10) участвует альдолаза; она катализирует обратимую конденсацию альдегида, в данном случае эритрозо-4-фосфата, с дигидроацетонфосфатом, в результате чего образуется семиуглеродное соединение *седогептулозо-1,7-дифосфат* (рис. 23-23). От седогептулозо-1,7-дифосфата отщепляется фосфатная группа в положении 1, и образовавшийся седогептулозо-7-фосфат

CH_2OH
C=O
HO—C—H
H—C—OH
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Фруктозо-6-фосфат

+

H
C=O
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Глицеральдегид-3-фосфат

⇅ Транскетолаза

H
C=O
H—C—OH
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Эритрозо-4-фосфат

+

CH_2OH
C=O
HO—C—H
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Ксилулозо-5-фосфат

Рис. 23-22. Транскетолазная реакция. Этот фермент, которому для проявления активности требуются тиаминпирофосфат и ионы Mg^{2+}, катализирует обратимый перенос кетоловой группы (выделена красным) с кетозофосфата на альдозофосфат.

вступает в еще одну транскетолазную реакцию. Продуктами этой реакции являются два разных пентозофосфата, которые в конечном счете и превращаются в рибулозо-1,5-дифосфат.

Все реакции, перечисленные на рис. 23-21, за исключением первой, катализируемой рибулозодифосфат-карбоксилазой, свойственны также и животным тканям. Из-за отсутствия рибулозодифосфат-карбоксилазы организм живот-

$CH_2—O—PO_3^{2-}$
C=O
CH_2OH

Дигидроксиацетонфосфат

+

H
C=O
H—C—OH
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Эритрозо-4-фосфат

⇅ Альдолаза

$CH_2—O—PO_3^{2-}$
C=O
HO—C—H
H—C—OH
H—C—OH
H—C—OH
$CH_2—O—PO_3^{2-}$

Седогептулозо-1,7-дифосфат

Рис. 23-23. Образование седогептулозо-1,7-дифосфата, катализируемое альдолазой. Этот фермент катализирует реакции конденсации различных альдегидов с дигидроксиацетонфосфатом.

ных не способен осуществлять реальное превращение CO_2 в глюкозу. Растения, у которых на первом этапе фиксации CO_2 участвует рибулозодифосфат-карбоксилаза, называются C_3-растениями, потому что CO_2 включается у них в трехуглеродное соединение.

23.22. Глюкоза служит предшественником типичных растительных углеводов – сахарозы, крахмала и целлюлозы

Глюкозо-6-фосфат, образующийся в процессе фотосинтеза, является предшественником трех типичных растительных углеводов – сахарозы, крахмала и целлюлозы, которые в животном организме не синтезируются.

Сахароза образуется путем переноса остатков D-глюкозы от UDP-глюкозы

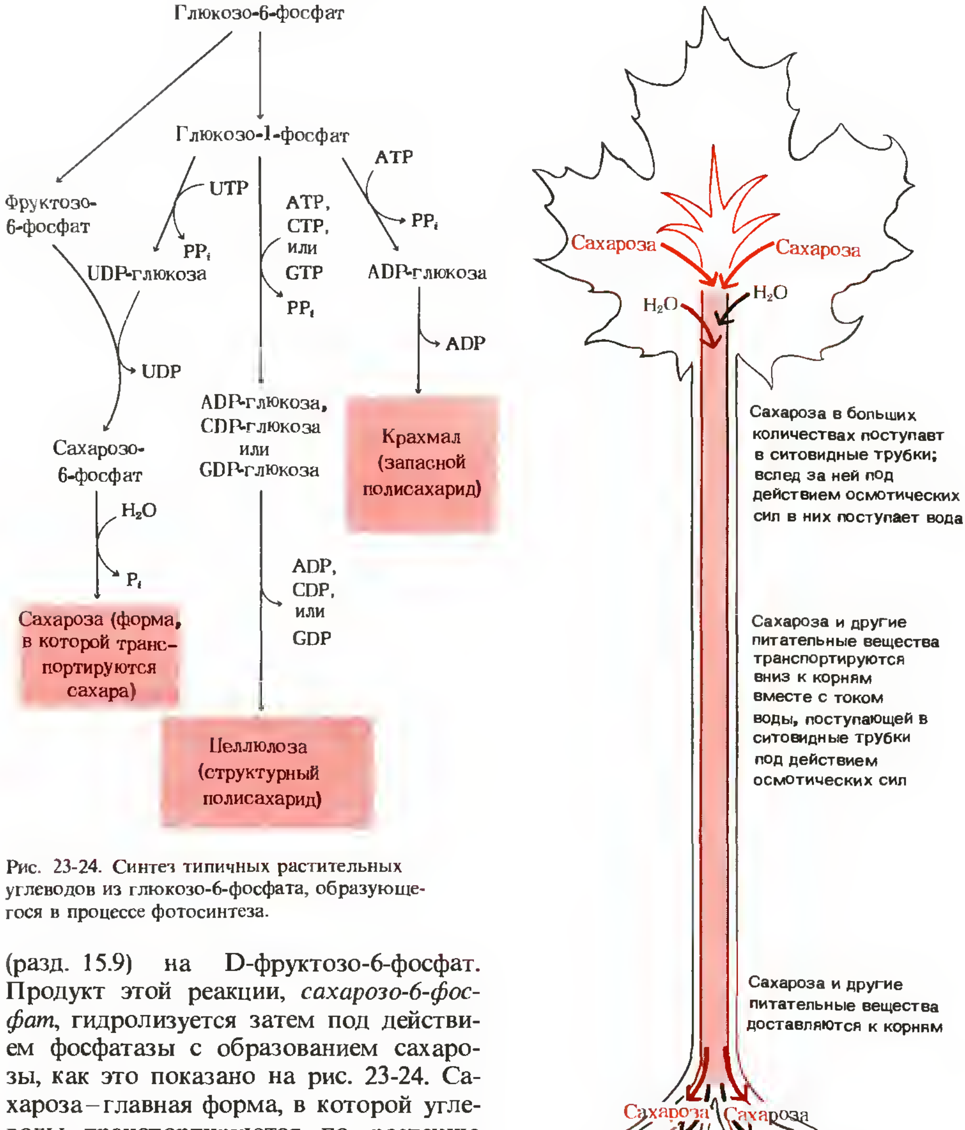


Рис. 23-24. Синтез типичных растительных углеводов из глюкозо-6-фосфата, образующегося в процессе фотосинтеза.

Рис. 23-25. Роль сахарозы в передвижении флоэмного сока к корням. В ситовидных трубках содержится сахароза, и благодаря этому в них за счет осмотических сил поступает вода. Это создает движущую силу, под действием которой флоэмный сок перемещается вниз к корням.

(разд. 15.9) на D-фруктозо-6-фосфат. Продукт этой реакции, *сахарозо-6-фосфат*, гидролизуется затем под действием фосфатазы с образованием сахарозы, как это показано на рис. 23-24. Сахароза – главная форма, в которой углеводы транспортируются по растению (рис. 23-25). Она образуется в листьях во время фотосинтеза и в больших количествах поступает в *ситовидные трубки*, своеобразные «капилляры» листьев. Возможно, что эта роль закрепилась за сахарозой в процессе эволюции потому, что имеющаяся в ее молекуле необычная связь между анамерным атомом углерода D-глюкозы в положении 1 и анамерным атомом углерода D-фруктозы в положении 2 не гидролизуется под действием амилаз и других обы-

чных ферментов, расщепляющих углеводы.

Целлюлоза, главный внеклеточный структурный полимер большинства растений (разд. 11.9), также образуется в растениях из D-глюкозы. Непосредственным предшественником глюкозных мономерных звеньев целлюлозы, связанных в полимерной цепи $\beta(1\rightarrow4)$-связями, служат в зависимости от вида растения ADP-глюкоза, CDP-глюкоза или GDP-глюкоза. Эти нуклеозиддифосфаты глюкозы сходны по своей структуре и функции с UDP-глюкозой (разд. 20.13), являющейся предшественником гликогена в животных тканях. Здесь, следовательно, перед нами еще один пример, свидетельствующий о той роли, которую играют различные нуклеотиды, направляя промежуточные продукты метаболизма на определенные биосинтетические пути (разд. 14.18).

Крахмал, мономерные звенья которого связаны в главных цепях $\alpha(1\rightarrow4)$-связями (разд. 11.8), образуется у большей части растений сходным путем из ADP-глюкозы (рис. 23-24).

23.23. Регуляция темновых реакций

Лимитирующим этапом, определяющим скорость темновых реакций, является фиксация CO_2 в реакции, катализируемой рибулозодифосфат-карбоксилазой и приводящей к образованию 3-фосфоглицерата. Риболозодифосфат-карбоксилаза, молекула которой состоит из 16 субъединиц, относится к аллостерическим ферментам. Она может активироваться под воздействием трех разных изменений, каждое из которых представляет собой результат освещения хлоропластов. Это следующие изменения:

1. Повышение pH. При освещении хлоропластов ионы H^+ переходят из стромы в тилакоиды. Это приводит к повышению pH стромы и активирует карбоксилазу, находящуюся на наружной поверхности тилакоидной мембраны.
2. Поступление в строму ионов Mg^{2+}. Ионы Mg^{2+} поступают в строму, когда ионы H^+ при освещении хлоропластов переходят из стромы в тилакоиды.
3. Накопление NADPH, генерируемого при освещении фотосистемой I.

Таким образом, хотя фиксация CO_2 под действием рибулозодифосфат-карбоксилазы принадлежит к темновым реакциям, она косвенным образом стимулируется освещением хлоропластов. Таким же непрямым путем активируются в результате освещения хлоропластов и некоторые другие ферменты, участвующие в цикле Кальвина, а также ATP-синтетаза.

23.24. В тропических растениях используется C_4-путь, или путь Хэтча–Слэка

У большей части тропических растений, а также у растений, возделываемых в умеренной зоне, но происходящих из тропиков, например у кукурузы, сахарного тростника или сорго, для фиксации CO_2 используется путь, называемый *C_4-путем*, или путем Хэтча–Слэка. Следует, однако, уяснить себе с самого начала, что и C_3- и C_4-растения в конечном счете используют описанный выше C_3-путь, подробно рассмотренный на рис. 23-21. Но между этими группами растений имеется существенное различие. Оно заключается в том, что у C_4-растений реакциям C_3-пути предшествуют дополнительные этапы, в ходе которых CO_2 предварительно, до того как она включится в фосфоглицерат, фиксируется в форме четырехуглеродного соединения (рис. 23-26). Познакомимся те-



Рис. 23-26. C_4-растения сначала включают CO_2 в C_4-соединение и лишь после двух предварительных этапов фиксируют CO_2 тем же путем, что и C_3-растения.

Воздух

CO_2

Оксалоацетат ← Фосфоенолпируват

NADPH

$NADP^+$

$AMP + PP_i$

$ATP + P_i$

Клетка мезофилла

Малат

Пируват

Клеточные мембраны

$NADP^+$ NADPH

Малат → Пируват

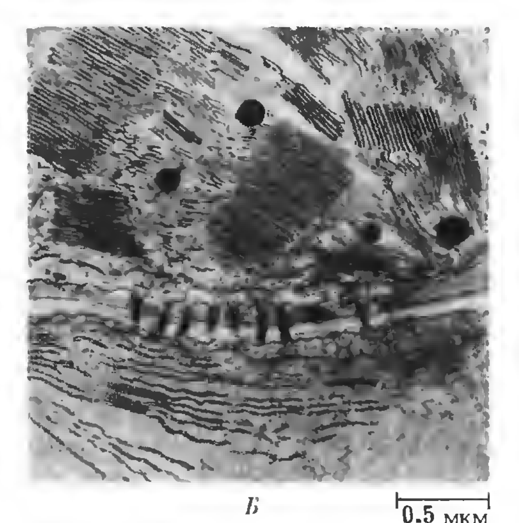
CO_2

Клетка обкладки

3ФГ РуДФ

Глюкоза

А



Б

Рис. 23-27. *А*. Путь фиксации CO_2 через промежуточные четырехуглеродные продукты (путь Хэтча–Слэка). Этот путь преобладает в растениях тропического происхождения. *Б*. Электронная микрофотография, на которой видны соединенные между собой клетка мезофилла (*внизу*) и клетка обкладки (*вверху*). Клетка обкладки содержит крахмальные зерна.

перь с тем, как функционирует C_4-путь.

В 60-х годах два австралийских биохимика растений М. Хэтч и С. Слэк обнаружили, что у растений тропического происхождения первым продуктом, в виде которого фиксируется радиоактивная CO_2, является четырехуглеродное соединение *оксалоацетат*. Реакция, приводящая к фиксации CO_2, протекает в клетках мезофилла листа (рис. 23-27) и катализируется *фосфоенолпируват-карбоксилазой*

$$\text{Фосфоенолпируват} + CO_2 \rightarrow \rightarrow \text{Оксалоацетат} + P_i.$$

Этот фермент, отсутствующий в животных тканях, не следует путать с *фосфоенолпируват-карбоксикиназой* (разд. 20.2), которая катализирует у животных реакцию, протекающую в процессе глюконеогенеза

$$\text{Фосфоенолпируват} + GDP + CO_2 \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + GTP.$$

Оксалоацетат, образовавшийся в клетках мезофилла, восстанавливается за счет NADPH с образованием малата

$$\text{Оксалоацетат} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \rightarrow \text{Малат} + \text{NADP}^+.$$

Далее следует этап, являющийся для C_4-цикла решающим. Малат, образовавшийся в клетках мезофилла и содержащий фиксированную CO_2, переносится в соседние клетки *обкладки* по особым соединениям, или каналам, связывающим клетки этих двух типов. В клетках обкладки малат декарбоксилируется с образованием пирувата и CO_2 под действием *малатдегидрогеназы*.

$$\text{Малат} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Пируват} + + CO_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+.$$

Свободная CO_2, образовавшаяся в клетках обкладки,– это та самая CO_2, которая была сначала фиксирована в мезофилле в форме оксалоацетата.

В клетках обкладки CO_2, выделившаяся при декарбоксилировании малата, снова фиксируется – на этот раз под действием рибулозодифосфат-карбоксилазы – в точно такой же реакции, какая у C_3-растений приводит к фиксации CO_2 в виде карбоксильной группы 3-фосфоглицерата. Пируват, образовавшийся при декарбоксилировании малата в клетках обкладки, переносится обратно в клетки мезофилла и превращается здесь в фосфоенолпируват в необычной ферментативной реакции, катализируемой ферментом *пируват-ортофосфат – дикиназой*

$$\text{Пируват} + P_i + \text{ATP} \rightarrow \rightarrow \text{Фосфоенолпируват} + \text{AMP} + PP_i.$$

Этот фермент получил название дикиназы, потому что он катализирует реакцию, в которой за счет одной молекулы ATP фосфорилируются одновременно две разные молекулы – пируват и фосфат; пируват фосфорилируется с образованием фосфоенолпирувата, а фосфат – с образованием пирофосфата. Позднее этот пирофосфат гидролизуется до фосфата, так что в конечном счете используются две высокоэнергетические связи ATP. Данная реакция обеспечивает, следовательно, регенерацию фосфоенолпирувата, который может теперь использоваться для фиксации еще одной молекулы CO_2 в клетках мезофилла.

После того, как в клетках обкладки произойдет фиксация CO_2 в виде 3-фосфоглицерата (вслед за ее предварительной фиксацией в виде малата в клетках мезофилла), все остальные реакции C_3-цикла, или цикла Кальвина, протекают точно так же, как показано на рис. 23-20 и 23-21. Таким образом, у C_4-растений фиксация CO_2 осуществляется в клетках мезофилла по C_4-пути, а синтез глюкозы идет в клетках обкладки по C_3-пути.

Второе важное обстоятельство, касающееся фиксации CO_2 у C_4-растений, заключается в том, что они расходуют на этот процесс больше энергии, чем C_3-растения. На каждую молекулу CO_2, фиксированную по C_4-пути, должна быть регенерирована одна молекула фосфоенолпирувата. Эта регенерация происходит, как показано выше, за счет двух высокоэнергетических фосфатных групп ATP. Поэтому для фиксации одной молекулы CO_2 C_4-растениям требуется в общей сложности пять молекул ATP, тогда как C_3-растения расходуют на это только три молекулы ATP.

23.25. C_4-путь обеспечивает необходимую концентрацию CO_2

Почему растениям может быть выгодно сначала фиксировать CO_2 в клетках одного типа, а затем тут же освобождать ее и вновь фиксировать, но уже в клетках другого типа, особенно если учесть, что этот сложный путь требует бóльших затрат энергии? Фундаментальные исследования биохимии и гистологии фиксации CO_2 у тропических растений позволили понять, в чем может заключаться смысл C_4-цикла.

Тропические растения должны избегать чрезмерных потерь воды при транспирации. Они достигают этого путем закрывания *устьиц*, которые служат листьям своего рода «трахеями». Однако при

закрывании устьиц уменьшается также и поступление атмосферной CO_2 в клетки обкладки. Вследствие этого концентрация CO_2 в клетках обкладки сравнительно невелика, из-за чего рибулозодифосфат-карбоксилаза не способна действовать с максимальной скоростью. У фосфоенолпируват-карбоксилазы, находящейся в клетках мезофилла, сродство к CO_2 гораздо выше. Поэтому фиксация CO_2 может происходить здесь более эффективно. Реакция, катализируемая фосфоенолпируват-карбоксилазой, обеспечивает фиксацию и накопление CO_2 в форме малата. При декарбоксилировании малата в клетках обкладки концентрация CO_2 достигает в них достаточно высокого уровня, при котором активность рибулозодифосфат-карбоксилазы приближается к максимальной.

Любопытный парадокс: хотя для фиксации одной молекулы CO_2 по пути Хэтча–Слэка C_4-растениям требуется пять высокоэнергетических фосфатных групп, а C_3-растениям их требуется только три, тем не менее C_4-растения тропического происхождения растут быстрее, чем C_3-растения умеренной зоны, и образуют больше биомассы на единицу листовой поверхности. (К несчастью для огородников, росичка и многие другие сорняки происходят из тропиков и принадлежат к C_4-типу, т. е. обладают способностью весьма эффективно превращать световую энергию в биомассу).

Попробуем понять, чтó лежит в основе этого парадокса.

23.26. Фотодыхание ограничивает продуктивность C_3-растений

У растений обоих типов, C_3 и C_4, ночью в митохондриях зеленых клеток листьев протекают процессы дыхания и фосфорилирования с расщеплением субстратов, созданных фотосинтезом в предшествующие световые периоды. Возникает вопрос: дышат ли клетки листа также и на свету, во время активного фотосинтеза, или же митохондриальное дыхание на это время выключается? Тщательные измерения скоростей выделения кислорода и поглощения CO_2 показали, что C_3-растения действительно дышат на свету и поглощают некоторое количество кислорода, в то время как в них протекает фотосинтез, при котором кислород выделяется. Это дыхание нельзя, однако, полностью приписать митохондриям. Оказалось, что оно лишь частично подавляется цианидом, ингибитором митохондриальной цитохром-оксидазы. Нечувствительное к цианиду дыхание, наблюдаемое у C_3-растений на свету, называется *фотодыханием.*

Фотодыхание представляется расточительством. Во-первых, часть восстановительной силы, генерируемой в световых реакциях, отвлекается таким путем на восстановление кислорода, вместо того чтобы расходоваться на биосинтез. Во-вторых, в отличие от митохондриального дыхания фотодыхание не сопровождается окислительным фосфорилированием. Следовательно, значительная часть солнечной энергии, улавливаемой в световых реакциях, растрачивается в процессе фотодыхания впустую. Важно для нас и третье обстоятельство: фотодыхание отличается особой активностью у C_3-растений, тогда как у растений тропического происхождения оно практически отсутствует.

Главным субстратом, окисляемым при фотодыхании у C_3-растений, является *гликолевая кислота* (рис. 23-28). В пероксисомах клеток листа гликолат окисляется до глиоксилата, который затем превращается в глицин и другие продукты. Реакция, приводящая в растительных клетках к образованию гликолата, в высшей степени необычна. Гликолат образуется в результате окислительного расщепления рибулозо-1,5-дифосфата. Эта реакция катализируется рибулозодифосфат-карбоксилазой – *тем же ферментом, который катализирует фиксацию CO_2, приводящую к образованию фосфоглицерата.* Как это возможно?

Дело в том, что рибулозодифосфат-карбоксилаза способна катализировать реакцию рибулозодифосфата *либо* с

$CH_2-O-PO_3^{2-}$
COO^- Фосфогликолат
↓ H_2O → P_i
CH_2OH
COO^- Гликолат
↓
H
C=O Глиоксилат
COO^-
↓ Трансаминирование
Глицин и
другие продукты

Рис. 23-28. При гидролизе фосфогликолата образуется гликолат – субстрат фотодыхания. Гликолат окисляется до глиоксилата, CO_2 и других продуктов.

$CH_2-O-PO_3^{2-}$
C=O
H—C—OH Рибулозо-1,5-дифосфат
H—C—OH
$CH_2-O-PO_3^{2-}$
↓ O_2 Рибулозодифосфат-карбоксилаза
$CH_2-O-PO_3^{2-}$ Фосфогликолат
COO^-
+
COO^-
H—C—OH 3-фосфоглицерат
$CH_2-O-PO_3^{2-}$
+
$2H^+$

Рис. 23-29. Оксигенирование рибулозо-1,5-дифосфата. В этой реакции нормальный субстрат, CO_2, заменен кислородом; поэтому вместо второй молекулы 3-фосфоглицерата образуется фосфогликолат.

CO_2, *либо* с O_2. Когда концентрация CO_2 низка, а концентрация O_2 сравнительно высока, молекула O_2 не только конкурирует с CO_2, но может и заменить ее. Необычная эта реакция приводит к тому, что рибулозодифосфат в C_3-растениях не карбоксилируется, а *оксигенируется*. При оксигенировании образуются *фосфогликолат* и *3-фосфоглицерат* (рис. 23-29) вместо двух молекул 3-фосфоглицерата, образующихся при карбоксилировании. Фосфогликолат затем гидролизуется с образованием свободного гликолата, который служит субстратом для фотодыхания.

В отличие от этого у C_4-растений отношение CO_2/O_2 в клетках обкладки остается всегда сравнительно высоким благодаря предшествующему C_4-этапу, т. е. условия здесь благоприятствуют карбоксилированию рибулозо-1,5-дифосфата. Кроме того, закрывание устьиц в листьях C_4-растений не только предотвращает потери воды, но и ограничивает поступление атмосферного кислорода в листья.

23.27. Фотодыхание – серьезная проблема для земледелия умеренной зоны

Хотя мы пока еще не знаем точно, какова биологическая роль фотодыхания, ясно, что оно заслуживает серьезного внимания, потому что в умеренной зоне оно снижает продуктивность C_3-растений, т. е. скорость образования растительной биомассы. В жаркий безветренный день в посевах C_3-растений концентрация CO_2 в воздухе над растениями может понизиться до 0,005% (нормальный уровень – 0,03%) из-за быстрого использования CO_2 в процессе фотосинтеза. В результате этого понижается и отношение CO_2/O_2 в воздухе над растениями, а значит, кислород начинает более успешно конкурировать с CO_2 в рибулозодифосфат-карбоксилазной реакции, так что фиксация CO_2 замедляется, а «разорительный» процесс фотодыхания, напротив, усиливается. Фотодыхание может на 50% снизить реальное образование биомассы у C_3-растений.

В настоящее время изыскиваются способы затормозить фотодыхание у C_3-растений и тем самым усилить у них фиксацию CO_2, а следовательно, и образование биомассы. Один из таких способов основан на ингибировании ферментов, катализирующих окисление гликолата. Другой подход заключается в культивировании сортов, которым присуща низкая скорость фотодыхания. Впрочем, не исключено, что эту проблему жизнь разрешит без нас, поскольку в связи с потреблением больших количеств ископаемого горючего содержание CO_2 в воздухе неуклонно растет (разд. 13.1).

23.28. Галофильные бактерии используют световую энергию для синтеза АТР

Галофильная («любящая соль») бактерия *Halobacterium halobium* запасает энергию поглощаемого солнечного света совершенно иным способом, нежели это делают истинные фотосинтезирующие организмы. Эти своеобразные бактерии обитают только в соленых прудах и соленых озерах (например, в Большом Соленом озере или в Мертвом море), т. е. там, где вследствие испарения воды концентрация соли очень высока; они вообще не способны существовать при концентрациях NaCl ниже 3 М. Эти бактерии аэробы, и обычно они используют для окисления своего органического «топлива» кислород. Однако в соленых прудах, где концентрация NaCl иногда превышает 4 М, растворимость кислорода очень низка. Поэтому галофильным бактериям приходится иногда использовать другой источник энергии – солнечный свет. В плазматической мембране, окружающей клетки *H. halobium*, имеются скопления светопоглощающих пигментов. Это так называемые *пурпурные пятна.* Они состоят из плотно упакованных молекул белка *бактериородопсина* (мол. масса 26000), содержащего в качестве простетической группы остаток *ретиналя*, или *альдегида витамина А* (разд. 10.14). При освещении клеток молекулы бактериородопсина переходят в возбужденное состояние и временно обесцвечиваются. Когда затем эти возбужденные молекулы бактериородопсина, находящиеся в мембране, возвращаются в исходное основное состояние, выделяющаяся энергия используется на перекачивание ионов H^+ из клетки в наружную среду, вследствие чего возникает трансмембранный градиент pH, обращенный кислым концом наружу. Поскольку при этом концентрация ионов H^+ снаружи выше, чем внутри, эти ионы стремятся диффундировать обратно в клетку через находящиеся в мембране молекулы АТР-синтезирующего фермента, напоминающего АТР-синтетазу митохондрий и хлоропластов. Проходя через эту бактериальную АТРазу, ионы H^+ отдают свою

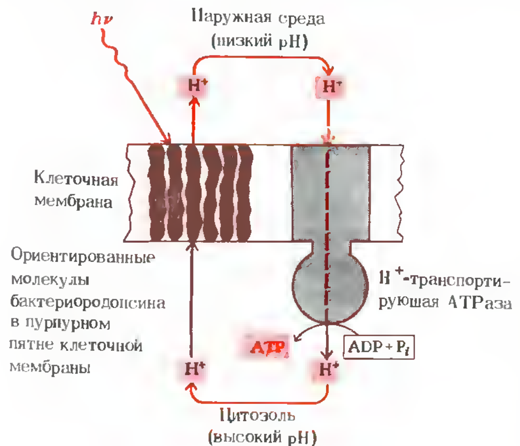


Рис. 23-30. У галофильных бактерий молекулы бактериородопсина, определенным образом ориентированные в клеточной мембране, служат насосом, который под действием света выкачивает ионы H^+ наружу. Возникающий в результате этого градиент ионов H^+ является источником энергии для синтеза АТР, катализируемого АТР-синтетазой.

энергию, которая используется для синтеза ATP из ADP и фосфата (рис. 23-30). Таким способом галофильные бактерии запасают световую энергию в форме ATP в дополнение к окислительному фосфорилированию, протекающему у них при наличии кислорода. Однако галофильные бактерии не выделяют кислорода и не осуществляют фотовосстановления $NADP^+$. Бактериородопсин, сравнительно небольшой белок (рис. 23-31), является самым простым из всех известных насосов, перекачивающих ионы H^+ за счет энергии света. Можно надеяться, что знакомство с его молекулярной структурой и механизмом действия позволит нам глубже заглянуть в сущность процессов светозависимого преобразования энергии и лучше понять работу H^+-насосов различных типов, функционирующих при дыхании и фотосинтезе.



Рис. 23-31. Кристаллы бактериородопсина.

23.29. Фотосинтезирующие организмы служат моделями для конструирования солнечных батарей

Фотосинтетические механизмы хлоропластов переводят солнечную энергию в химическую энергию ATP и NADPH в высшей степени эффективно. Поэтому ведется много исследований с целью научиться воспроизводить эти процессы в более простых искусственных молекулярных системах и таким образом заставить работать на себя непрерывно льющийся на Землю неиссякаемый поток солнечной энергии. В современных солнечных батареях в качестве рецепторов световой энергии используются дорогостоящие твердые материалы, например кристаллический силикон, и эти батареи работают далеко не столь эффективно, как хлоропласты растений. Если бы нам удалось на молекулярном и субатомном уровне понять до конца те принципы, на основе которых хлорофилл и бактериородопсин работают как высокоэффективные ловушки световой энергии, и одновременно выяснить, как происходит распределение по обе стороны мембраны электрических зарядов и ионов H^+, т. е. как возникают богатые энергией электрохимические градиенты, то мы, возможно, оказались бы в состоянии эффективно воспроизводить эти процессы с помощью дешевых материалов. Фундаментальные биохимические и биофизические исследования энергопреобразующих мембран фотосинтезирующих организмов важны поэтому не только как средство приблизиться к пониманию природы. Они могут иметь и долгосрочные практические последствия для таких областей человеческой дейтельности, как сельское хозяйство, производство энергии или защита окружающей среды от CO_2, H_2SO_4 и других загрязнений, возникающих в качестве побочных продуктов при сжигании ископаемого горючего.

Краткое содержание главы

В световых реакциях фотосинтеза у зеленых растений поглощенная световая энергия создает поток электронов, направленный от H_2O к $NADP^+$, который при этом восстанавливается в NADPH; одновременно выделяется кислород, входивший ранее в состав воды. Вторым продуктом световых реакций

является ATP. В темновых реакциях ATP и NADPH используются для восстановления CO_2, приводящего к образованию глюкозы. В клетках зеленых растений фотосинтез протекает в хлоропластах. Световые реакции происходят в тилакоидах – уплощенных мембранных пузырьках, находящихся внутри хлоропластов. В фотосинтезирующих растительных клетках присутствуют светопоглощающие пигменты двух главных типов – хлорофиллы и каротиноиды, объединенные в два вида фотосистем. В каждой фотосистеме имеется набор светособирающих, или антенных, пигментов и реакционный центр, использующий световую энергию для передачи электронов в цепь электронных переносчиков. Фотосистема I возбуждается более длинноволновым светом; при ее участии электроны восстанавливают $NADP^+$ в NADPH. Фотосистема II активируется более коротковолновым светом; она ответственна за отщепление электронов от H_2O и выделение кислорода. Возбуждение фотосистемы I приводит к восстановлению $NADP^+$ через ферредоксин и ферредоксин-NADP – оксидоредуктазу. Электроны для заполнения дырок в фотосистеме I поступают от возбужденной фотосистемы II. Они переносятся по цепи переноса электронов, соединяющей фотосистемы II и I, с которой сопряжено фотосинтетическое фосфорилирование. Электроны, необходимые для заполнения дырок в фотосистеме II, обладающей высокой окислительной способностью, поступают от H_2O. Источником энергии для синтеза ATP служит трансмембранный H^+-градиент, создаваемый потоком электронов, направленным «вниз». Для того чтобы обеспечить выделение одной молекулы кислорода и образование двух молекул NADPH и двух молекул ATP, требуется восемь квантов света.

В темновых реакциях происходит фиксация CO_2, приводящая к образованию углеродного скелета глюкозы. Фиксация осуществляется посредством реакции CO_2 с рибулозо-1,5-дифосфатом, продуктами которой являются две молекулы 3-фосфоглицерата. 3-фосфоглицерат превращается в глюкозу через цикл Кальвина, причем на каждую синтезированную молекулу глюкозы расходуются 18 молекул ATP и 12 молекул NADPH, образовавшихся в световых реакциях. Цикл Кальвина состоит из взаимосвязанных реакций пентозофосфатного и гликолитического путей. У C_4-растений CO_2 фиксируется сначала в клетках мезофилла с образованием малата, переходящего затем в клетки обкладки. Здесь CO_2 вновь высвобождается, и ее концентрация оказывается достаточно высокой, чтобы могла произойти реакция, катализируемая рибулозодифосфат-карбоксилазой. После этой реакции весь процесс идет уже по C_3-пути. У C_3-растений часть добытой в процессе фотосинтеза энергии теряется в результате фотодыхания. Субстратом для фотодыхания служит гликолат – продукт оксигенирования рибулозо-1,5-дифосфата.

Бактериородопсин, содержащийся в клеточной мембране галофильных бактерий, при освещении перекачивает ионы H^+ из клетки в окружающую среду. Возникающий вследствие этого трансмембранный H^+-градиент используется клетками для синтеза ATP.

ЛИТЕРАТУРА

Свет

Hendricks S. B. How Light Interacts with Living Matter, Sci. Am., 219, 174–186, September 1968.

Фотореакции

Govindjee and *Govindjee R.* The Primary Events in Photosynthesis, Sci. Am., 231, 8–82, December 1974.

Фотосинтетический перенос электронов и фосфорилирование

Blankenship R. E., Parson W. W. The Photochemical Electron Transfer Reactions of Photosynthetic Bacteria and Plants, Annu. Rev. Biochem., 44, 635–653 (1978).

Hinkle P. C., McCarty R. E. How Cells Make ATP, Sci. Am., 238, 104–123 (1978).

Miller K. R. The Photosynthetic Membrane, Sci. Am., 241, 102–113, October 1979.

Путь углерода

Bassham J. A The Path of Carbon in Photosynthesis, Sci. Am., 206, 88–100, June 1962.

Zelitch I. Pathways of Carbon Fixation in Green Plants, Annu. Rev. Biochem., **44**, 123–145 (1975).

Фотодыхание

Bjorkman O., Berry J. High-Efficiency Photosynthesis, Sci. Am., 229, 80–93, October 1973.

Osmond C. B. Photorespiration and Photoinhibition. Implications for the Bioenergetics of Photosynthesis, Biochem, Biophys. Acta, 639, 77–156 (1981).

Бактериородопсин

Singh K., Caplan S. R. The Purple Membrane and Solar Energy Conversion, Trends Biochem. Sci., 5, 62–64, March 1980.

Stoeckenius W. The Purple Membrane of Salt-Loving Bacteria, Sci. Am., 234, 38–46 (1976).

Книги

Govindjee (ed.). Bioenergetics of Photosynthesis, Academic, New York, 1975.

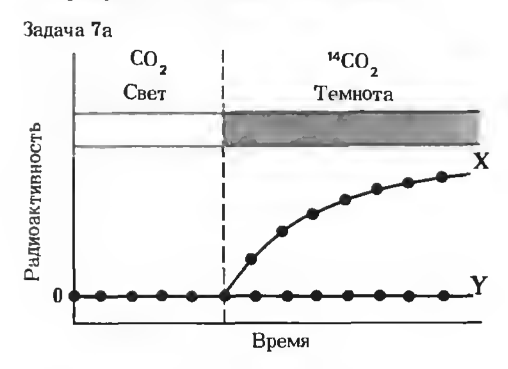
Gregory R. P. F. The Biochemistry of Photosynthesis, 2d ed., Wiley, New York, 1977.

Stumpf P. K., Conn E. E. (eds.). The Biochemistry of Plants, 8 vols., Academic, New York, 1980–1981. Том 8 посвящен фотосинтезу.

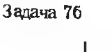
Вопросы и задачи

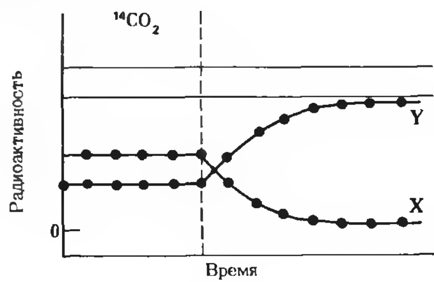
1. *Фазы фотосинтеза.* Если суспензию зеленых водорослей сначала освещать в отсутствие двуокиси углерода, а затем инкубировать с $^{14}CO_2$ в темноте, то в течение короткого промежутка времени наблюдается превращение $^{14}CO_2$ в ^{14}C-глюкозу. Что нам говорит это наблюдение о двух фазах фотосинтеза? Почему превращение $^{14}CO_2$ в ^{14}C-глюкозу быстро прекращается?
2. *Фотохимическая эффективность света с различной длиной волны.* При освещении зеленого растения светом с длиной волны 680 или 700 нм скорость фотосинтеза, измеряемая по выделению O_2, в первом случае оказывается выше. Однако освещение растения светом с той и другой длиной волны одновременно обеспечивает более высокую скорость фотосинтеза, чем освещение каждым светом в отдельности. Объясните причину этого.
3. *Роль H_2S у некоторых фотосинтезирующих бактерий.* У пурпурных серных бактерий при освещении может идти фотосинтез в присутствии H_2O и $^{14}CO_2$, но только в том случае, если имеется H_2S, а кислород отсутствует. В ходе фотосинтеза (скорость которого измеряется по образованию ^{14}C-глюкозы) H_2S превращается в элементарную серу, а кислород не выделяется. Какую роль играет превращение H_2S в элементарную серу? Почему не выделяется кислород?
4. *Увеличение восстановительной силы фотосистемы I в результате поглощения света.* Когда фотосистема I поглощает красный свет с длиной волны 700 нм, восстановительный потенциал P700 изменяется от +0,4 до −0,6 В. Какая доля поглощенного света улавливается в форме восстановительной силы?
5. *Механизм действия гербицида диурона.* Если обработать хлоропласты таким мощным гербицидом, как диурон [3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина], то выделение кислорода и фотофосфорилирование прекращаются. Выделение кислорода (но не фотофосфорилирование) можно восстановить, добавив какой-нибудь внешний акцептор электронов, например реагент Хилла. Как действует этот гербицид, когда он убивает сорняки? В какой точке схемы, изображенной на рис. 23-12, может сказываться, по вашему мнению, его ингибирующее действие? Дайте аргументированный ответ.
6. *Биоэнергетика фотофосфорилирования.* Стационарные концентрации ATP, ADP и P_i в изолированных хлоропластах шпината при полном освещении и pH 7 равны соответственно 120, 6 и 700 мкМ.
   а) Сколько требуется свободной энергии для синтеза 1 моля ATP при этих условиях?
   б) Энергию для синтеза ATP поставляет перенос электронов в хлоропластах, индуцированный светом. При какой минимальной разности потенциалов должен происходить перенос пары электронов в этих условиях для обеспечения синтеза ATP?
7. *Идентификация ключевых промежуточных продуктов в темновых реакциях фотосинтеза.* Кальвин с сотрудниками использовали при изучении темновых реакций фотосинтеза одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella*. В своих экспериментах эти исследователи инкубировали освещаемые суспензии водорослей с $^{14}CO_2$ при различных условиях, а затем прослеживали динамику появления ^{14}C в двух продуктах, X и Y, в зависимости от условий опыта.

а) Клетки *Chlorella* выращивались на свету в присутствии немеченой CO_2; затем свет выключали и добавляли $^{14}CO_2$. В этих условиях ^{14}C обнаруживался у водорослей прежде всего в продукте X. Продукт Y оставался немеченым.



б) Клетки *Chlorella* выращивались на свету в присутствии $^{14}CO_2$. Свет выключали по исчерпании всей CO_2 (прерывистая вертикальная линия). В этих условиях продукт X быстро включал метку, но затем ее утрачивал. Радиоактивность продукта Y со временем, напротив, возрастала. Основываясь на знании цикла Кальвина, назовите соединения, о которых идет здесь речь.





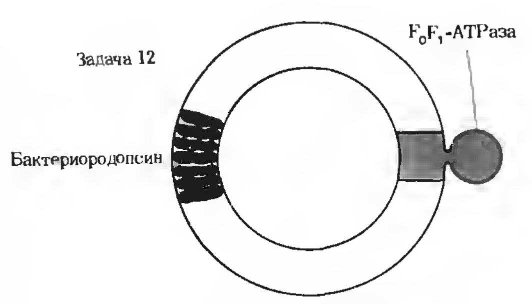
8. *Регуляция рибулозо-1,5-дифосфат—карбоксилазы путем изменения pH.* У рибулозо-1,5-дифосфат—карбоксилазы величина K_M для CO_2 с повышением pH среды заметно снижается. Как сказывается это снижение на скорости фиксации CO_2 в рибулозодифосфаткарбоксилазной реакции? Как может растение использовать это свойство для регуляции скорости фотосинтеза при освещении? Какую роль играет эта регуляция в растении в темное время суток?

9. *Путь фиксации CO_2 у кукурузы.* Если освещать растение кукурузы в присутствии газообразной $^{14}CO_2$, то уже примерно через 1 с свыше 90% всей радиоактивности, включенной в листьях, обнаруживается в С-4 малата, аспартата и оксалоацетата. В С-1 3-фосфоглицерата ^{14}C появляется лишь по истечении 60 с. Объясните эти результаты.

10. *Химизм малатдегидрогеназы: вариации одной темы.* Малатдегидрогеназа, содержащаяся в клетках обкладки C_4-растений, катализирует реакцию, для которой можно указать аналогичную реакцию в цикле лимонной кислоты. Назовите эту аналогичную реакцию. Объясните, в чем заключается аналогия.

11. *Отсутствие фотосистемы II в клетках мезофилла.* У тропических злаков в клетках мезофилла имеется только фотосистема I, а фотосистема II отсутствует. У тех же растений в клетках обкладки имеются обе фотосистемы, I и II. Согласуется ли это обстоятельство с той ролью, которую играет у этих растений путь Хэтча–Слэка? Дайте полный ответ.

12. *Эксперименты по реконструкции: ATP-синтезирующие пузырьки.* В. Стокениус и Э. Рэкер сообщили об интересных экспериментах по реконструкции. В этих экспериментах использовались инвертированные синтетические фосфолипидные пузырьки, содержавшие молекулы бактериородопсина из *Halobacterium halobium* и F_0F_1-ATPазу из митохондрий бычьего сердца. При освещении эти пузырьки синтезировали ATP из ADP и P_i. Однако если их освещали в присутствии динитрофенола, то образования ATP не происходило. Объясните эти результаты исходя из хемиосмотической гипотезы.

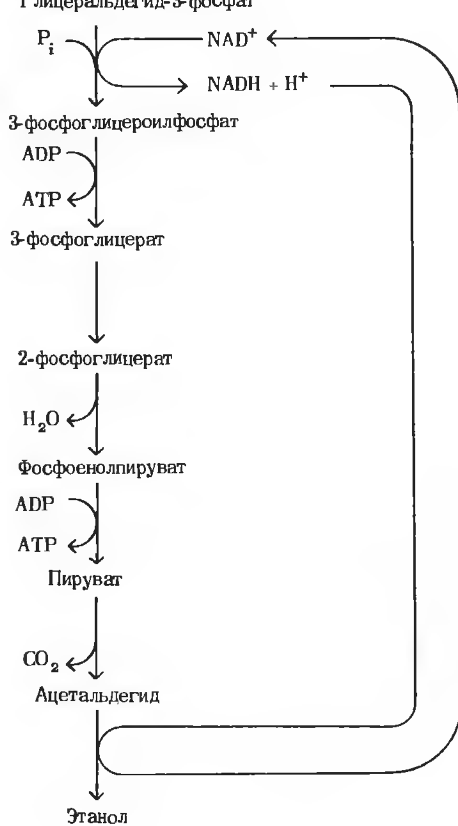


ПРИЛОЖЕНИЕ

ОТВЕТЫ

Глава 13

1. а) Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + + NAD^+ → 3-фосфоглицероилфосфат + + NADH + H^+.
   3-фосфоглицероилфосфат + ADP → 3-фосфоглицерат + ATP.
   3-фосфоглицерат → 2-фосфоглицерат.
   2-фосфоглицерат → Фосфоенолпируват + + H_2O.
   Фосфоенолпируват + ADP → Пируват + + ATP.
   Пируват → CO_2 + Ацетальдегид.
   Ацетальдегид NADH + H^+ → Этанол + + NAD^+.
   б) Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + + 2ADP → Этанол + CO_2 + 2ATP + H_2O.
   в)



2. а) Оксалат + Формил-CoA → Формиат + Оксалил-CoA.
   Оксалил-CoA + H^+ → CO_2 + Формил-CoA.
   Формиат + NAD^+ → CO_2 + NADH.
   б) Оксалат + H^+ + NAD^+ → $2CO_2$ + + NADH.
3. ^{14}C-глюкоза распадается на более мелкие фрагменты, которые затем используются в биосинтезе гистидина. Немеченый гистидин действует как ингибитор по обратной связи, блокируя путь, по которому происходит синтез гистидина.
4. а) Уровнем β-галактозидазы; б) из-за того, что число оборотов фермента не изменяется; в) процесс индукции обладает высокой специфичностью.
5. а) Глюкоза + 2ATP → Фруктозо-1,6-дифосфат + 2ADP.
   б) Фруктозо-1,6-дифосфат + $2H_2O$ → → Глюкоза + $2P_i$.
   в) Различия состоят в том, что при катаболическом пути потребляются две молекулы ATP, а при анаболическом пути – две молекулы воды. Таким образом, эти два пути нельзя представить как обращение одного и того же ряда реакций.
   г) Обращению процесса препятствуют два термодинамически выгодных переноса фосфата от ATP к глюкозе.
   д) Превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат и обратно в этих двух путях метаболизма не может катализироваться одним и тем же ферментом, так как при этом протекают разные процессы, что видно из суммарной записи реакции. Вместе с тем взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата осуществляется одним и тем же ферментом.
6. а) $5 \cdot 10^{-4}$ М; б) $9 \cdot 10^6$ имп/мин.
7. $1,1 \cdot 10^{-4}$ М.

Глава 14

1. а) $-1,1^3$ ккал/моль; б) $+1,80$ ккал/моль; в) $-3,27$ ккал/моль.
2. а) 267 М; б) 622 М; в) 0,28.
3. 9,7.
4. а) $3,75 \cdot 10^{-3}$ $М^{-1}$; $8,64 \cdot 10^{-8}$ М; нет; б) 13,9 М; нет; в) $\Delta G^{0\prime} = -4,0$ ккал/моль; $K'_{eq} = 873$; концентрация глюкозы $1,12 \times$ $\times 10^{-7}$ М; да; г) нет. д) При прямом переносе фосфатной группы от ATP к глю-

козе энергетический потенциал ATP позволяет протекать реакции без образования в высоких концентрациях промежуточных соединений. Сущность такого переноса, конечно, составляет ферментативный катализ.

5. а) −3,0 ккал; б) −3.5 ккал.
6. −2,4 ккал.
7. 11,0 ккал/моль.
8. а) 11,0 ккал/моль; б) 46 кг; 68%; в) ATP синтезируется по мере необходимости и его концентрация поддерживается на постоянном уровне.
9. а) 1,1 с; б) Креатинфосфат + ADP → Креатин + ATP.

   в) Синтез ATP в процессе катаболизма глюкозы, аминокислот и жирных кислот.
10. а) + 0,2 ккал/моль. б) Пирофосфатаза катализирует гидролиз пирофосфата и сдвигает суммарную реакцию в сторону синтеза ацетил-СоА.

Глава 15

1. Глюкоза + 2ATP → 2-глицеральдегид-3-фосфат + ADP + $2H^+$; $\Delta G^{0\prime} = +0{,}56$ ккал/ /моль.
2. Глицеральдегид-3-фосфат + 2ADP + + $2P_i$ + H^+ → Лактат + 2ATP + H_2O; $\Delta G^{0\prime} = -15{,}0$ ккал/моль.
3. Фруктоза + 2ADP + $2P_i$ = 2Лактат + 2ATP + + $2H_2O$.
4. а) $^{14}CH_3$—CH_2—OH; б) 3-^{14}C-глюкоза или 4-^{14}C-глюкоза.
5. Величина K_M гексокиназы (0,1 мМ) в 100 раз ниже, чем K_M глюкокиназы (10,0 мМ). При нормальной концентрации глюкозы в крови (5 мМ) гексокиназа полностью связана с глюкозой и работает с максимальной эффективностью, тогда как глюкокиназа насыщена лишь частично. Пока потребность мышц в глюкозо-6-фосфате невелика (например, в отсутствие усиленной физической работы), повышенная концентрация глюкозо-6-фосфата приводит к выключению гексокиназы, Таким образом, утилизация глюкозы мышцами имеет место даже в случае, когда уровень глюкозы в крови ниже нормы, но не происходит при малой потребности в глюкозо-6-фосфате. В отличие от гексокиназы глюкокиназа не ингибируется глюкозо-6-фосфатом; это важное свойство обеспечивает утилизацию глюкозы печенью, даже когда потребность в глюкозо-6-фосфате минимальна (например, при биосинтезе гликогена). Когда уровень глюкозы в крови нормализуется, глюкокиназа перестает работать и утилизация глюкозы печенью прекращается.
6. Нет; лактатдегидрогеназа необходима для регенерации NAD^+ из NADH, образующегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата.
7. а) Продуктом будет 3-фосфоглицерат. б) В присутствии арсената при анаэробных условиях не накапливается ATP.
8. а) Согласно стехиометрии спиртового брожения, на моль глюкозы требуется 2 моля P_i. б) Восстановление ацетальдегида до этанола необходимо для регенерации NAD^+ из NADH. При брожении фруктозо-1,6-дифосфат накапливается, чтобы восстановить запас аденозинфосфатов. в) В присутствии арсената не происходит накопления ATP.
9. Глицерол + $2NAD^+$ + ADP + P_i → Пируват + 2NADH + ATP + $2H^+$.
10. а) Q = 0,029; б) $K'_{eq} = 316$; в) В физиологических условиях реакция не находится в равновесии: фосфофруктокиназа регулируется.
11. а) Существуют два участка связывания ATP: каталитический и регуляторный. б) Интенсивность гликолиза снижается при избытке ATP. в) График свидетельствует о том, что при добавлении ADP снимается ингибирование, вызываемое ATP. Поскольку пул аденозинфосфатов относительно постоянен, расход ATP приводит к повышению уровня ADP. Имеются данные, свидетельствующие о том, что активность фосфофруктокиназы регулируется соотношением ATP и ADP.
12. а) Гликоген-фосфорилаза катализирует превращение запасенного гликогена в глюкозо-1-фосфат. Глюкозо-1-фосфат служит предшественником глюкозо-6-фосфата – промежуточного продукта гликолиза. При усиленной работе скелетным мышцам требуются большие количества глюкозо-6-фосфата. Вместе с тем в печени расход гликогена используется для поддержания постоянного уровня глюкозы в крови в промежутках между приемами пищи. б) В активно работающих мышцах, где очень высока потребность в ATP, необходимо, чтобы глюкозо-1-фосфат образовывался быстро – для этого нужна большая V_{max}.
13. Случай А: (е), (3); случай Б: (в), (3); случай В: (а), (4); случай Г: (г), (6).
14. При недостаточности галактокиназы накапливается галактоза. При недостаточности галактозо-1-фосфат–уридилил–трансферазы накапливается галактозо-1-фосфат. Последний более токсичен.

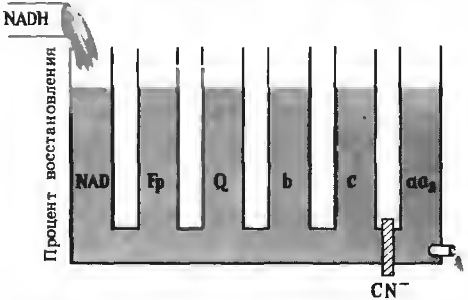
Глава 16

1. а) *Цитрат-синтаза:*
Ацетил-CoA + Оксалоацетат + H_2O → → Цитрат + CoA-SH + H^+.
Аконитаза: Цитрат → Изоцитрат.
Изоцитратдегидрогеназа:
Изоцитрат + NAD^+ → α-Кетоглутарат + + CO_2 + NADH.
α-Кетоглутаратдегидрогеназа:
α-Кетоглутарат + NAD^+ + CoA-SH → → Сукцинил-CoA + CO_2 + NADH.
Сукцинил-CoA-синтетаза:
Сукцинил-CoA + P_i + GDP → Сукцинат + + GTP + CoA-SH.
Сукцинатдегидрогеназа:
Сукцинат + FAD → Фумарат + $FADH_2$.
Фумараза: Фумарат + H_2O → Малат.
Малатдегидрогеназа:
Малат + NAD^+ → Оксалоацетат + + NADH + H^+.
б) и в) Этап 1: CoA, конденсация; этап 2: изомеризация; этап 3: NAD^+, окисление, декарбоксилирование; этап 4: NAD^+, CoA. тиаминпирофосфат, окисление, декарбоксилирование; этап 5: CoA, фосфорилирование; этап 6: FAD, окисление; этап 7: гидратация; этап 8: NAD^+, окисление.
г) Ацетил-CoA + $3NAD^+$ + FAD + GDP + + P_i + $2H_2O$ → $2CO_2$ + 3NADH + $FADH_2$ + + GTP + $2H^+$ + CoA.
2. а) Окисление; Метанол → Формальдегид + + H—H.
б) Окисление; Формальдегид → Муравьиная кислота + H—H.
в) Восстановление; CO_2 + H—H → Муравьиная кислота.
г) Восстановление; Глицериновая кислота + H—H → Глицеральдегид.
д) Окисление; Глицерол → Дигидроксиацетон + H—H.
е) Окисление; $2H_2O$ + Толуол → Бензойная кислота + 3H—H.
ж) Окисление; Сукцинат → Фумарат + + H—H.
з) Окисление; Пировиноградная кислота + + H_2O → Уксусная кислота + H—H + + CO_2.
3. а) Этанол + NAD^+ → Ацетальдегид + + NADH + H^+.
б) 3-фосфоглицероилфосфат + NADH + + H^+ → Глицеральдегид-3-фосфат + + NAD^+ + HPO_4^{2-}.
в) Пируват + H^+ → Ацетальдегид + CO_2.
г) Пируват + NAD^+ → Ацетат + NADH + + H^+ + CO_2.
д) Оксалоацетат + NADH + H^+ → Малат + NAD^+.
е) Ацетоацетат + H^+ → Ацетон + CO_2.
4. а) Потребление кислорода служит мерой активности двух первых этапов клеточного дыхания – гликолиза и цикла лимонной кислоты. Добавление оксалоацетата или малата стимулирует цикл лимонной кислоты и тем самым стимулирует дыхание. б) Добавленный оксалоацетат (или малат) выполняет в цикле лимонной кислоты роль катализатора, поскольку на последнем этапе цикла он образуется вновь.
5. а) $6{,}0 \cdot 10^{-6}$; б) $1{,}2 \cdot 10^{-8}$ М; в) 30 молекул.
6. а) $^-OOCCH_2CH_2COO^-$ (сукцинат). б) Малонат служит конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. в) Блокировка цикла лимонной кислоты прерывает образование NADH, что в свою очередь останавливает транспорт электронов. В результате такой остановки прекращается дыхание. г) Добавлением сукцината в большом избытке.
7. а) Добавьте равномерно меченную ^{14}C-глюкозу и последите за выделением $^{14}CO_2$. б) Поровну распределится между положениями 2 и 3 в оксалоацетате. в) Бесконечно много.
8. а) Положение 1; б) положение 3; в) положение 3; г) входит в состав метильной группы; д) поровну распределится между —CH_2-группами; е) положение 4; ж) поровну распределится между положениями 2 и 3.
9. Нет; карбоксилированием пирувата.
10. а) На стадии действия аконитазы путем ее ингибирования. б) Фторцитрат; конкурирует с цитратом; большим избытком цитрата. в) Цитрат и фторцитрат – ингибиторы фосфофруктокиназы. г) Катаболические процессы, ведущие к образованию ATP полностью подавлены.
11. 2пируват + ATP + $2NAD^+$ + H_2O → α-кетоглутарат + CO_2 + ADP + P_i + 2NADH + + $3H^+$.
12. 2Ацетил-CoA + $2NAD^+$ + FAD + H_2O → → Оксалоацетат + 2CoA + 2NADH + + $4H^+$ + $FADH_2$.
13. Отношение начальной скорости образования $^{14}CO_2$ из 1-^{14}C-глюкозы к начальной скорости образования CO_2 из 6-^{14}C-глюкозы должно быть 2/1.

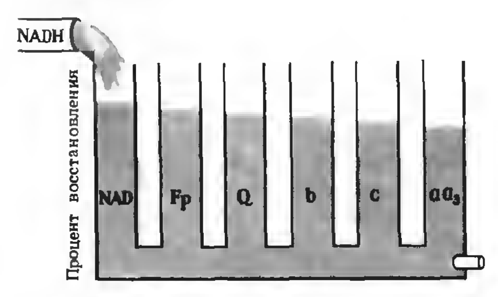
Глава 17

1. 1): а) и г) NADH; б) и д) E—FMN; в) $NADH/NAD^+$ и E—$FMNH_2$/E—FMN.
2): а) и г) E—$FMNH_2$; б) и д) Fe^{3+}; в) E—$FMNH_2$/E—FMN и Fe^{2+}/Fe^{3+}.
3): а) и г) Fe^{2+}; б) и д) Q; в) Fe^{2+}/Fe^{3+} и Q/QH_2.

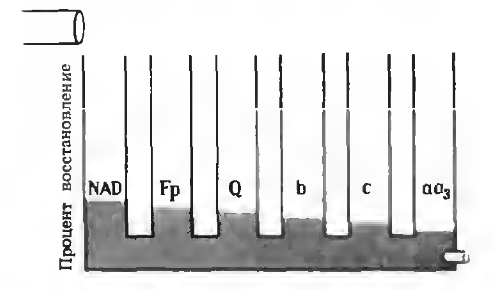
2. а) NAD^+/NADH; б) Пируват/Лактат; в) в направлении образования лактата; г) −6,0 ккал; д) $1,6 \cdot 10^4$.
3. Ферредоксин-фосстанавливающий субстрат → ферредоксин → цитохром b_6 → цитохром f → пластоцианин; на первом и последнем этапах.
4. а) 39; б) 12; в) 20; г) 76.
5. а) 1,14 В; б) −52,6 ккал; в) ~7.
6. Окисление сукцината с помощью FAD характеризуется отрицательной величиной изменения стандартной свободной энергии ($\Delta G^{0\prime} = -0,9$ ккал), тогда как окисление с помощью NAD^+ характеризуется соответствующей положительной величиной ($\Delta G^{0\prime} = 16,1$ ккал).
7. а) Цианид блокирует восстановление кислорода, катализируемое цитохромом aa_3.



б) В отсутствие кислорода восстановленные переносчики электронов повторно не окисляются.



в) В отсутствие NADH не все переносчики электронов окисляются кислородом.



г) См. рис. 17-14,*А*.

8. а) Ингибирование NADH-дегидрогеназы ротеноном снижает скорость транспорта электронов, что в свою очередь уменьшает скорость образования АТР. Если уменьшенная скорость образования АТР не способна удовлетворить потребности организма, то животное погибает. б) Антимицин А сильно ингибирует окисление убихинола в цепи транспорта электронов. Это снижает скорость транспорта электронов и приводит к последствиям, описанным в п. а). в) Антимицин.
9. а) В присутствии разобщающего агента интенсивность транспорта электронов, необходимого для удовлетворения потребности в АТР, уменьшается, причем с ростом концентрации агента уменьшение становится более резким и отношение Р/О стремится к нулю. б) Отношение Р/О уменьшается. в) В присутствии разобщающего агента требуются более высокие скорости окисления клеточного топлива. Если отношение Р/О становится слишком малым, количество синтезируемого при этом АТР не достаточно для поддержания жизни. г) Он может действовать как разобщающий агент.
10. а) Подавляется образование АТР. б) Образование АТР тесно сопряжено с транспортом электронов; 2,4-динитрофенол–разобщитель окислительного фосфорилирования. в) Олигомицин.
11. в) Олигомицин ингибирует оба процесса; атрактилозид не влияет на транспорт электронов и на синтез АТР в инвертированных пузырьках.
12. а) Бурый жир вырабатывает тепло, чтобы поддерживать температуру тела у новорожденных. б) Несопряженное окислительное фосфорилирование; повышенное потребление АТР; менее трех мест фосфорилирования.
13. а) Будет протекать только анаэробная фаза гликолиза, б) Потребление кислорода прекратится. в) Образование лактата возрастет. г) Синтез АТР прекратится.
14. а) Регенерация NAD^+ из NADH происходит с помощью транспорта электронов. б) Окислительное фосфорилирование более эффективно. в) При высоком отношении действующих масс системы синтеза АТР фосфофруктокиназа ингибируется.
15. а) Мышечное сокращение. б) Оно стимулирует гликолиз и дыхание. в) См. рис. 17-29.
16. а) В окружающей среде $4,0 \cdot 10^{-8}$ М; в матриксе $2,0 \cdot 10^{-8}$ М; б) 2/1; в) 21; г) нет; д) трансмембранный потенциал.

в) Без метки

13 $$CH_3-CH(OH)-COOH + \tfrac{9}{2}O_2 + 25ADP + 25P_i + 25H^+ \longrightarrow 4CO_2 + 29H_2O + 25ATP$$

Глава 18

1. Остатки жирных кислот.
2. а) $9{,}5 \cdot 10^4$ ккал; б) 48 дней; в) около 227 г в день.
3. Первый этап в окислении жирных кислот аналогичен превращению сукцината в фумарат; второй этап аналогичен превращению фумарата в малат; третий этап аналогичен превращению малата в оксалоацетат.
4. а) R—COOH + ATP → Ацил-AMP + PP_i; Ацил-AMP + CoA-SH → R—CO—S—CoA + + AMP. б) Необратимым гидролизом пирофосфата до неорганического фосфата с помощью клеточной пирофосфатазы.
5. Да; удаленный тритий обнаруживается в виде тритиевой воды.
6. Около 1,1 л воды на 1 кг трипальмитина.
7. Полное окисление углеводородов до двуокиси углерода и воды.
8. а) Фенилуксусная кислота; молекулярная масса 136; б) нечетное.
9. Поскольку митохондриальный запас кофермента А мал, он должен постоянно возобновляться путем образования кетоновых тел для того, чтобы поддерживать процесс β-окисления, необходимый для получения энергии.
10. а) Отсутствие углеводов вызовет снижение активности цикла лимонной кислоты; б) с нечетным числом атомов.

11 а)
$$CH_3(CH_2)_{12}-C(=O)-S-CoA + 6CoA\text{-}SH + 6FAD + 6NAD^+ + 6H_2O \rightarrow 7\ acetyl\text{-}CoA + 6FADH_2 + 6NADH + 6H^+$$

б) $$CH_3(CH_2)_{16}COOH + ATP + 9CoA\text{-}SH + 8FAD + 8NAD^+ + 9H_2O \rightarrow 9\ acetyl\text{-}CoA + AMP + 2P_i + 8FADH_2 + 8NADH + 10H^+$$

в) $$CH_3-CH(OH)-CH_2COOH + NAD^+ + ATP + 2CoA\text{-}SH + H_2O \rightarrow 2\ acetyl\text{-}CoA + NADH + AMP + 2P_i + 3H^+$$

12 а) $$CH_3-{}^{14}C(=O)-S-CoA$$

б) $$^{-}OOC-CH_2-C(OH)(COO^-)-CH_2-{}^{14}C(=O)-O^-$$

Глава 19

1 а) $^{-}OOC-CH_2-C(=O)-COO^-$ Оксалоацетат

б) $^{-}OOC-CH_2-CH_2-C(=O)-COO^-$ α-Кетоглутарат

в) $CH_3-C(=O)-COO^-$ Пируват

г) $C_6H_5-CH_2-C(=O)-COO^-$ Фенилпируват

2. Описанная процедура представляет собой сопряженную реакцию, в которой продукт медленного трансаминирования (пируват) быстро вступает в последующую индикаторную реакцию, катализируемую лактатдегидрогеназой. За протеканием индикаторной реакции следят с помощью спектрофотометра, наблюдая исчезновение характерной желтой окраски NADH, обусловленной поглощением при 340 нм.
3. Нет; азот аланина может посредством трансаминирования переноситься на оксалоацетат с образованием аспартата.
4. а) Фенилаланин-4-монооксигеназа; диета с пониженным содержанием фенилаланина. б) Нормальный путь обмена Phe–гидроксилирование с образованием Tyr–блокирован, и потому Phe накапливается. в) Phe превращается в фенилпируват при трансаминировании и в фениллактат при восстановлении. г) Тирозин служит предшественником в синтезе меланина–пигмента, представляющего собой красящее вещество волос.
5. Катаболизм углеродного скелета валина, метионина и изолейцина будет ослаблен.

6. Из 1 молекулы лактата образуется 17 молекул ATP, а из 1 молекулы аланина – 15 молекул ATP (с учетом энергетических затрат на выведение азота).
7. а) $^{15}NH_2—CO—^{15}NH_2$

б) $^-OOC—CH_2—CH_2—^{14}COO^-$

в) $R—NH—C(=^{15}NH)—^{15}NH_2$

г) $R—NH—C(=O)—^{15}NH_2$

д) Без метки

е) $^-OOC—CH(^+NH_3)—CH_2—^{14}COO^-$

и

$^-OO^{14}C—CH(^{+15}NH_3)—CH_2—COO^-$

8. а) Изолейцин → II → IV → I → V → III → → Ацетил-CoA + Пропионил-CoA. б) Этап 1: трансаминирование; этап 2: окислительное декарбоксилирование, аналогичное окислительному декарбоксилированию пирувата в ацетил-CoA; этап 3: окисление, аналогичное дегидрированию сукцината; этап 4: гидратация, аналогичная гидратации фумарата с образованием малата; этап 5: окисление, аналогичное дегидрированию малата в оксалоацетат; этап 6: тиолиз (процесс, обратный альдольной конденсации), аналогичный тиолазной реакции.
9. а) Голодание приводит к снижению уровня глюкозы в крови; предложенная в опыте диета вызывает быстрый катаболизм глюкогенных аминокислот. б) Повышение уровня аммиака обусловлено окислительным дезаминированием; отсутствие Arg (промежуточного продукта в цикле мочевины) препятствует превращению аммиака в мочевину; Arg у кошек синтезируется в недостаточном количестве и не удовлетворяет потребности, возникшие в эксперименте в условиях стресса. в) Orn превращается в Arg в цикле мочевины.
10. O_2 + 2глутамат + CO_2 + 2ADP + $2P_i$ → → 2α-кетоглутарат + $3H_2O$ + 2ATP + + Мочевина.

Глава 20

1. На превращение 2 молекул пирувата в одну молекулу глюкозы затрачиваются энергия (4ATP + 2GTP) и восстановительные эквиваленты (2NADH). Необходимые энергия и восстановительные эквиваленты образуются в цикле лимонной кислоты или окислительного фосфорилирования в результате катаболизма аминокислот, жирных кислот или углеводов.
2. а) ^{14}C в глюкозе не обнаружится; б) 3,4-^{14}C-глюкоза.
3. Пируваткарбоксилаза – это митохондриальный фермент. Образовавшийся ^{14}C-оксалоацетат смешивается с пулом оксалоацетата, используемого в цикле трикарбоновых кислот. Следовательно, между ^{14}C-оксалоацетатом и промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот устанавливается равновесие с образованием через ^{14}C-сукцинат смеси 1-^{14}C- и 4-^{14}C-оксалоацетата. Из оксалоацетата, меченного ^{14}C в положении 1, образуется 3,4-^{14}C-глюкоза [см. задачу 2(б)].
4. Фосфофруктокиназа: активируется AMP и ингибируется ATP, регулирует гликолиз; фруктозодифосфатаза: активируется ATP и ингибируется AMP, регулирует глюконеогенез.
5. а), б) и г) Глюкогенные соединения; в) и д) нет.
6. а) Быстрым повышением скорости гликолиза; повышение уровней пирувата и NADH приводит к возрастанию концентрации лактата. б) Лактат превращается в глюкозу через пируват; это более медленный процесс, потому что образование пирувата зависит от доступности NAD^+; кроме того, равновесие реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой, сдвинуто в сторону образования лактата, а превращение пирувата в глюкозу требует затраты энергии. в) Равновесие реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой, сдвинуто в сторону образования лактата.
7. Если катаболический и анаболический пути превращения глюкозы функционируют одновременно, то ATP будет потребляться, а реального синтеза глюкозы происходить не будет. Такие циклы называют холостыми.
8. Наблюдение, согласно которому гликогенсинтаза обладает самой низкой активностью по сравнению с другими ферментами синтеза гликогена, наводит на мысль, что этот ферментативный этап представляет собой узкое место данного метаболического пути и, следовательно, точку его регуляции. Это подтверждается наблюдением, что стимуляция синтеза гликогена путем активации регуляторного фермента приводит к снижению концентрации промежуточных продуктов до точки регуляции и к повышению концентрации мета-

болитов после точки регуляции. Активация гликоген-синтазы повышает скорость протекания этой стадии, что вызывает уменьшение равновесной концентрации UDP-глюкозы и увеличение равновесной концентрации UDP.

9. На превращение 1 моля глюкозо-6-фосфата затрачивается 1 моль ATP; это составляет 2,6% общего количества ATP, образующегося при полном расщеплении глюкозо-6-фосфата, т.е. эффективность хранения составляет 97,4%.
10. UDP-глюкозопирофосфорилаза.
11. Использование глюкозы и ее предшественника оксалоацетата для образования молока в условиях активного катаболизма жирных кислот приводит к кетозу. Жвачные могут легко превращать пропионат в сукцинил-CoA (рис. 20-7) и далее в оксалоацетат, что предотвращает кетоз.
12. Присутствие UDP-галактозопирофосфорилазы обеспечивает катаболизм галактозы по следующему пути:

Галактоза + ATP $\xrightarrow{\text{Галактокиназа}}$ Галактозо-1-фосфат + ADP

UTP + Галактозо-1-фосфат $\xrightarrow{\text{(Новый фермент)}}$ UDP-галактоза + PP_i

UDP-галактоза $\xrightarrow{\text{Галактозо-4-эпимераза}}$ UDP-глюкоза

Суммарная реакция: Галактоза + ATP + + UTP → UDP-глюкоза + ADP + PP_i

UDP-глюкоза затем утилизируется для синтеза гликогена или же гидролизуется до UMP и глюкозо-1-фосфата.

Глава 21

1. CO_2 участвует в ацетил-CoA-карбоксилазной реакции; инкубация с $^{14}CO_2$ не ведет к включению ^{14}C в пальмитат.
2. а) Равномерно меченный ^{14}C-ацетил-CoA превращается в ^{14}C-малонил-CoA; эти предшественники в свою очередь превращаются в равномерно меченный ^{14}C-пальмитат. б) Если к большому избытку немеченого малонил-CoA добавить следовые количества ^{14}C-ацетил-CoA, ^{14}C не включится в метаболический пул малонил-CoA; поэтому образуется только 15,16-^{14}C-пальмитат.
3. 8Ацетил-CoA (митохондриальный) + + 15ATP + 14NADPH + $9H_2O$ → Пальмитат + 8CoA + 15ADP + $15P_i$ + $14NADP^+$ + + $2H^+$.
4. а) 3 атома дейтерия на 1 молекулу пальмитата; все три будут расположены у C-16. б) 7 атомов дейтерия на одну молекулу пальмитата;

$$CH_3-CH_2-(\underset{D}{\overset{H}{C}}-CH_2)_6-\underset{D}{\overset{H}{C}}-COO^-$$

5. Ацетил-CoA (митохондриальный) + + NADH + $NADP^+$ + 2ATP + $2H_2O$ → → Ацетил-CoA (цитозольный) + NAD^+ + + NADPH + 2ADP + $2P_i$ + $2H^+$.
6. Скорость биосинтеза жирных кислот лимитируется стадией карбоксилирования ацетил-CoA, катализируемого ацетил-CoA—карбоксилазой. Высокие уровни цитрата и изоцитрата указывают на то, что синтез жирных кислот протекает в благоприятных условиях вследствие активной работы цикла лимонной кислоты, в процессе которого образуется большой запас ATP, восстановленных пиридиннуклеотидов и ацетил-CoA. Следовательно, цитрат стимулирует (увеличивает V_{max}) протекание ферментативной реакции, являющейся лимитирующим этапом биосинтеза жирных кислот. Кроме того, поскольку цитрат прочнее связывается с нитевидной (активной) формой фермента, присутствие цитрата сдвигает равновесие между двумя формами в сторону активной формы. Наоборот, пальмитоил-CoA (конечный продукт биосинтеза жирных кислот) сдвигает равновесие в сторону неактивной формы. Поэтому по мере образования конечного продукта биосинтеза жирных кислот скорость биосинтеза снижается.
7. 3Пальмитиновая кислота + Глицерол + + 7ATP + $4H_2O$ → Трипальмитин + 7ADP + + $7P_i$ + $7H^+$.
8. Дигидроксиацетонфосфат + NADH + + Пальмитиновая кислота + Олеиновая кислота + 3ATP + CTP + Холин + $4H_2O$ → → Фосфатидилхолин + NAD^+ + 2AMP + + ADP + CMP + $5P_i$ + H^+; 7 молекул ATP на 1 молекулу фосфатидилхолина.
9. β-Ситостерол имитирует некоторые регуляторные функции холестерола, например подавление ферментов во время синтеза холестерола, всасывание холестерола, ингибирование синтеза ферментов.
10. $^{14}CH_3-CH_2-(^{14}CH_2-CH_2)_6-^{14}CH_2-$ $-COO^-$; Ala может служить предшественником пальмитата.
11. а) Они не являются простым обращением один другого; анаболический путь требует гидролиза трех дополнительных молекул ATP на один оборот цикла. б) Различия суммированы в табл. 21-1.

Глава 22

1. Если фенилаланин—4-оксидаза дефектна, путь биосинтеза Tyr блокирован и Tyr должен поступать с пищей.
2. Глюкоза + $2CO_2$ + $2NH_4^+$ → Аспартат + + $4H^+$ + $2H_2O$.
3. 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат.
4. Бактериальные мутанты, которые не способны синтезировать Gly, Asp или Glu, обычно требуют добавки пуринов – аденина и гуанина. Кроме того, для ауксотрофов по Asp и Glu необходимо, чтобы в среде содержались уридин и цитозин, а для ауксотрофов по Gly дополнительные пиримидины не нужны.
5. а) Быстрое деление клеток, подобных раковым, зависит от скорости синтеза ДНК. Поскольку синтез ДНК лимитируется недостатком дезокситимидилата, блокирование синтеза последнего, вызванное необратимым ингибированием тимидилат-синтазы под действием F-dUMP, снижает скорость деления клеток и тем самым рост тканей. б) Тетрагидрофолат превращается в N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат в процессе биосинтеза глицина из серина:

   Серин + Тетрагидрофолат → Глицин + + N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат + H_2O.

   Ингибирование дигидрофолатредуктазы метотрексатом препятствует превращению дигидрофолата обратно в N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат. Поэтому, как только у клеток возникает дефицит N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата, необходимого для синтеза dTMP, сразу снижается скорость синтеза ДНК, деления клеток и роста тканей. Хотя метотрексат воздействует и на нормальные клетки, это воздействие не так опасно, потому что нормальные клетки в любом случае растут медленнее.
6. Организмы не запасают нуклеотиды в качестве источника энергии и не расщепляют их до конца, а гидролизуют лишь до оснований, а затем реутилизируют эти основания с помощью особых (salvage) метаболических путей. Из-за низкого отношения углерода к азоту нуклеотиды представляют собой бедный источник энергии.
7. а) Как показано на рис. 22-7, *n*-аминобензойная кислота – это компонент N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата, кофактора, участвующего в переносе одноуглеродных фрагментов. б) Стрептоцид – структурный аналог *n*-аминобензойной кислоты. В присутствии стрептоцида бактерии не могут синтезировать тетрагидрофолат – кофактор, необходимый для превращения 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимидазола в 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-N^5-формиламиноимидазол при добавлении —СНО; поэтому предшественник и накапливается. в) Добавление избытка *n*-аминобензойной кислоты снимает подавление роста и накопление рибонуклеотидов, поскольку *n*-аминобензойная кислота и стрептоцид конкурируют за один и тот же активный центр фермента (конкурентное ингибирование), участвующего в биосинтезе тетрагидрофолата. Такое конкурентное ингибирование (гл. 9) устраняется добавлением избытка субстрата.
8. Лечение подагры аллопуринолом приводит к двум биохимическим последствиям. Во-первых, подавляется превращение гипоксантина в мочевую кислоту, в результате чего накапливается гипоксантин, который выводится легче (он более растворим), чем мочевая кислота. Это облегчает решение клинических проблем, связанных с расщеплением AMP. Во-вторых, ингибируется также превращение гуанина в мочевую кислоту. При этом накапливается ксантин, который, к сожалению, растворяется еще хуже, чем мочевая кислота. Это служит причиной образования ксантиновых камней. Поскольку основной путь образования ксантина из гипоксантина подавлен аллопуринолом, уровень распада GMP ниже уровня распада AMP, и вероятность возникновения ксантиновых камней при лечении подагры аллопуринолом меньше, чем при отсутствии лечения.
9. Бактерии в корневых клубеньках находятся в симбиозе с растением: растение поставляет ATP и восстановительные эквиваленты, а бактерии – ионы аммония, получаемые путем восстановления атмосферного азота. На это восстановление затрачивается большое количество ATP.
10.

Глава 23

1. Эти наблюдения наводят на мысль, что ATP и NADPH образуются на свету; превращение прекращается, как только за-

пасы NADPH и ATP оказываются исчерпанными.

2. Для того чтобы фотосинтез протекал с максимальной скоростью, фотосистема I (которая поглощает при 700 нм) и фотосистема II (которая поглощает при 680 нм) должны работать одновременно.
3. Пурпурные серные бактерии используют H_2S в качестве донора водорода при фотосинтезе. Кислород не выделяется, поскольку у бактерий отсутствует фотосистема II.
4. 0,57.
5. Диурон блокирует процесс переноса электронов от фотосистемы II к первому участку, соответствующему реакции образования ATP.
6. а) +13,4 ккал; б) 0,29 В.
7. X – 3-фосфоглицерат, Y – рибулозо-1,5-дифосфат.
8. Снижение K_M для CO_2 при повышении pH среды активирует рибулозо-1,5-дифосфат—карбоксилазу и тем самым повышает скорость фиксации CO_2. При освещении pH среды повышается. Ночью при отсутствии освещения активность рибулозо-1,5-дифосфат—карбоксилазы уменьшается и интенсивность фотодыхания снижается.
9. У кукурузы CO_2 фиксируется в ходе реакций, называемых путем Хэтча–Слэка: фосфоенолпируват быстро карбоксилируется до оксалоацетата (часть которого в результате трансаминирования превращается в аспартат) и восстанавливается до малата. Только после последующего декарбоксилирования CO_2 наконец попадает в цикл Кальвина.
10. В цикле лимонной кислоты роль, аналогичную малатдегидрогеназе в реакциях пути Хэтча–Слэка, играет изоцитратдегидрогеназа.
11. Поскольку фотосистема I может синтезировать ATP с помощью циклического фотофосфорилирования, для осуществления пути Хэтча–Слэка в клетках мезофилла требуется лишь фотосистема I.
12. При освещении протоны накачиваются бактериородопсином внутрь фосфолипидных пузырьков. Затем этот градиент протонов используется митохондриальной F_0F_1-ATPазой для синтеза ATP.

ОГЛАВЛЕНИЕ

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Издательство «Мир»
предлагает Вашему вниманию
книги выпуска 1986 г.
по генетике и молекулярной биологии

Льюин Б. ГЕНЫ. В 2-х томах. Пер. с англ., 77 л., 6 р. 20 к. за комплект.

Фундаментальное руководство по молекулярной биологии и генетике, написанное очень четко и ясно.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДНК. Краткий курс. Пер. с англ., 30 л., 4 р. 30 к.

В книге лауреата Нобелевской премии Дж. Уотсона и его соавторов описаны приемы генетической инженерии и результаты их применения при изучении генома эукариот. Показаны прикладные возможности генетической инженерии в медицине, генетике растений, биотехнологии.

Макгрегор Г., Варли Дж. МЕТОДЫ РАБОТЫ С ХРОМОСОМАМИ ЖИВОТНЫХ. Пер. с англ., 17 л., 2 р. 10 к.

Альберт Л. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Том 2

Научиые редакторы: Н. М. Амельяичик, Т. И. Поиомарева
Мл. иаучи. редактор З. В. Соллертииская
Художиик Г. А. Шипов
Художествеиный редактор Л. М. Кузиецова
Техиический редактор И. И. Володина
Корректор Т. П. Пашковская

ИБ № 4077

Сдаио в иабор 26.09.84.
Подписаио к печати 07.08.85.
Формат 70 × $100^1/_{16}$.
Бумага офсетиая.
Печать офсетная. Гариитура таймс.
Объем 11,50 бум. л. Усл. печ. л. 29,90.
Усл. кр.-отт. 59,80. Уч. изд. л. 33,21. Изд. № 4/3305.
Тираж 25000 экз. Зак. 950. Цеиа 2 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО МИР
129820, ГСП, Москва, I-110, I-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государствеииом комитете СССР по делам издательств, полиграфии и киижиой торговли. 143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.